

Université de Montréal

**Hypoxémie et inflammation systémique
après ischémie cérébrale aiguë chez le rat Wistar**

Par

Alain Gendron

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Pharmacologie

Décembre, 2004

© Alain Gendron, 2004



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Hypoxémie et inflammation systémique
après ischémie cérébrale aiguë chez le rat Wistar**

présentée par :
Alain Gendron

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr René Cardinal
Président-rapporteur

Dr Édouard Kouassi
Directeur de recherche

Dr Patrick du Souich
Codirecteur de recherche

Dr Jeanne Teitelbaum
Codirectrice de recherche

Dr Louis-Eric Trudeau
Membre du jury

Dr Antoine Hakim
Examineur externe

Dr Jean-Yves Lapointe
Représentant du doyen de la FES

SOMMAIRE

L'hypoxémie et l'inflammation systémique sont des complications importantes de l'accident vasculaire cérébral (AVC), et elles représentent des cibles thérapeutiques potentielles. Ce travail visait un triple but: premièrement, mieux caractériser l'influence de l'AVC de type ischémique sur l'état homéostatique de l'oxygène ainsi que les changements hématologiques associés; deuxièmement, mieux caractériser l'influence de l'AVC ischémique sur les médiateurs de l'inflammation systémique; et troisièmement, évaluer si les changements hématologiques et immunologiques induits par l'AVC démontrent une asymétrie cérébrale. Les objectifs spécifiques étaient : (i) Évaluer les modifications des gaz sanguins, l'érythropoïétine (EPO) plasmatique, le compte des globules rouges, l'hématocrite et les globules blancs sanguins dans le modèle animal bien établi d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM) chez le rat; (ii) Déterminer la cinétique d'induction des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α dans le cerveau, le sang et la rate après occlusion de l'ACM; (iii) Comparer les effets de l'occlusion unilatérale de l'ACM gauche ou droite sur les globules rouges et les globules blancs sanguins, les concentrations de la norépinéphrine ainsi que sur le nombre et la fonction des globules blancs spléniques. Les rats Wistar ont subi l'occlusion transitoire de l'ACM durant 1 heure à l'aide d'un filament intraluminal. Des groupes d'animaux opérés et des animaux contrôle (sham) ont été évalués et comparés à court et à long terme après reperfusion pour déterminer le volume de l'infarctissement, ainsi que les variables neurologiques, physiologiques, hématologiques et immunologiques. Les résultats montrent que l'hypoxémie apparaît 6-24 heures après reperfusion et est accompagnée d'une augmentation des taux plasmatiques d'EPO. Les globules rouges et l'hématocrite sont élevés de façon transitoire 2-7 jours après reperfusion. À l'inverse, les globules blancs sanguins sont diminués durant la même période. L'expression des trois cytokines (IL-1 β , IL-6 et TNF- α) est augmentée de façon transitoire dans le sang et la rate, atteignant un pic à 2 jours, suivi d'un retour au taux basal à 7 jours. On note une augmentation transitoire de la concentration plasmatique de la norépinéphrine, un efflux rapide des globules blancs spléniques et une stimulation soutenue des réponses prolifératives des lymphocytes T et B spléniques aux mitogènes *in vitro*. Aucune différence significative n'a été observée dans les changements hématologiques et immunologiques induits par les lésions ischémiques des hémisphères cérébraux gauche ou droit. Ces résultats démontrent que l'hypoxémie apparaît et persiste durant plusieurs heures après

occlusion de l'ACM chez le rat Wistar, ce qui supporte les observations cliniques antérieures et renforce l'importance de suivre l'évolution des paramètres physiologiques à long terme. De plus, l'augmentation transitoire de l'EPO, de la norépinéphrine et des cytokines tant dans le cerveau qu'en périphérie ainsi que la diminution du nombre des lymphocytes et l'augmentation de leur état d'activation dans les organes lymphoïdes périphériques sont autant d'indications d'une réaction inflammatoire systémique post-ischémie. Les modifications hématologiques et immunologiques observées en périphérie, de même que les réponses du système nerveux autonome sont indépendantes de l'hémisphère affecté par les lésions ischémiques, indiquant l'absence d'une asymétrie cérébrale dans ce modèle. L'absence d'asymétrie des effets de l'AVC sur ces paramètres est probablement reliée à la grande taille des lésions ischémiques qui affectent aussi bien les zones corticales que sous-corticales.

Mots clés. Accident vasculaire cérébral, ischémie cérébrale aiguë, hypoxémie, inflammation, érythropoïétine, asymétrie cérébrale, sous-populations lymphocytaires, prolifération lymphocytaire.

SUMMARY

Hypoxemia and systemic inflammation are of significant concern in stroke patients as secondary causes of brain injury, and represent potential targets for therapeutic interventions. The goal of this study was threefold: first, to further characterize the influence of ischemic stroke on systemic oxygen homeostasis and related hematological changes; second, to further characterize the influence of ischemic stroke on systemic inflammation; and third, to evaluate whether stroke-induced changes in hematological and immunological parameters display to cerebral asymmetry. Specific objectives were: (i) To evaluate changes in blood gases, plasma erythropoietin (EPO), red blood cell (RBC) count, hematocrit, and white blood cell (WBC) count in the well-established animal model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats; (ii) To assess the temporal induction of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the brain, blood and spleen after MCAO; and (iii) To compare the effects of unilateral left and right MCAO on RBC and WBC counts, plasma concentration of norepinephrine and on the number and function of spleen leukocytes. Wistar rats underwent 1-hour transient MCAO using the intraluminal thread technique. Groups of MCAO and sham-operated animals were evaluated and compared at extended times after reperfusion for assessment of infarct volume, as well as neurological, physiological, hematological and immunological variables. Results showed that hypoxemia occurred from 6 to at least 24 hours post-reperfusion and was accompanied by a concomitant increase of plasma EPO levels. RBC counts and hematocrit were transiently increased 2-7 days after reperfusion. In contrast, WBC counts decreased during the same time period. Expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α was transiently increased both in blood and spleen, with a maximum at 2 days, and normalization by 7 days. A transient increase of the plasma concentration of norepinephrine, as well as a rapid efflux of leukocytes from the spleen and a sustained stimulation of *in vitro* proliferative responses of spleen T and B lymphocytes to mitogens were observed. There was no difference, however, in the changes of the hematological and immunological parameters between left and right MCAO. These findings demonstrate that hypoxemia occurs and persists several hours after MCAO in Wistar rats, consistent with previous clinical observations, and reinforce the importance of monitoring physiological variables at longer time points than those routinely performed in both human and animal stroke models. Also, this study shows that cerebral

ischemia induces a transient increase of EPO and NE, a immune cell redistribution and activation, indicating a systemic inflammatory response. The hematological and immunological changes observed in periphery as well as the response of the autonomous nervous system indicates an absence of asymmetric effects of left versus right stroke. This is probably due to the large cerebral ischemic lesions affecting both cortical and subcortical areas.

Key words. Stroke, acute cerebral ischemia, hypoxemia, inflammation, erythropoietin, cerebral asymmetry, lymphocyte subsets, lymphocyte proliferation.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
SUMMARY.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES FIGURES.....	xviii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xix
REMERCIEMENTS.....	xxii

PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1. L'ACCIDENT VASCULAIRE CÉRÉBRAL (AVC).....	2
1.1. Introduction.....	2
1.2. Anatomie du système circulatoire en jeu dans l'AVC ischémique aigu...	3
1.3. Étiologie des AVC.....	5
1.3.1. AVC ischémique.....	5
1.3.1.1. Thrombose intracrânienne.....	5
1.3.1.2. Athérosclérose extracrânienne.....	6
1.3.1.3. AVC cardio-embolique.....	7
1.3.1.4. Anomalies hématologiques et de la coagulation.....	7
1.3.2. AVC hémorragique.....	8
1.3.2.1. Hémorragie cérébrale parenchymateuse.....	8
1.3.2.2. Hémorragie sous-arachnoïdienne.....	9
1.3.2.3. Hémorragies sous-durale et épidurale.....	9

1.4.	Facteurs de risque des AVC.....	10
1.4.1.	Facteurs de risque non modifiables des AVC.....	10
1.4.2.	Facteurs de risque modifiables et prévention primaire des AVC.....	10
1.5.	Traitement d'un AVC aigu.....	12
1.5.1.	Reperfusion.....	12
1.5.2.	Augmentation de la perfusion des territoires ischémiques.....	13
1.5.3.	Utilisation des anticoagulants et des antiplaquettaires dans le traitement aigu de l'AVC.....	13
1.5.4.	Les agents neuroprotecteurs	14
1.6.	Prévention secondaire.....	15
1.7.	Conclusion.....	16

CHAPITRE 2. MODÈLES ANIMAUX D'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE

AIGÜE	17	
2.1.	Introduction.....	17
2.2.	Modèles d'ischémie cérébrale aiguë globale.....	18
2.2.1.	Modèle d'occlusion carotidienne bilatérale chez la gerboise.....	18
2.2.2.	Modèles d'occlusion de deux et quatre vaisseaux chez le rat.....	19
2.2.2.1.	Modèle d'occlusion de deux vaisseaux chez le rat.....	19
2.2.2.2.	Modèle d'occlusion de quatre vaisseaux chez le rat.....	19
2.3.	Modèles d'ischémie cérébrale aiguë focale.....	20
2.3.1.	Modèles d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM).....	22
2.3.2.	Modèle d'ischémie cérébrale par photothrombose.....	23
2.3.3.	Modèle d'ischémie cérébrale par thrombo-embolie.....	23
2.3.4.	Modèle de l'endothéline.....	23
2.4.	Paramètres à mesurer et embûches des modèles d'ischémie cérébrale aiguë.....	24
2.4.1.	Température.....	24
2.4.2.	Tension artérielle et gaz du sang artériel.....	25
2.4.3.	Surveillance de la glycémie.....	25
2.4.4.	Anesthésie.....	25

2.5.	Modèles animaux utilisés pour l'étude de nouveaux agents neuroprotecteurs.....	26
2.6.	Conclusion.....	27

CHAPITRE 3. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE AIGÜE.....

3.1.	Introduction.....	29
3.2.	La cascade ischémique.....	29
3.2.1.	Zone centrale ischémie et pénombre ischémique.....	30
3.2.2.	Défaillance énergétique.....	33
3.2.3.	Déséquilibre ionique et homéostasie du calcium.....	36
3.2.4.	Excitotoxicité.....	37
3.2.4.1.	Rôle majeur du glutamate et du calcium dans la cascade ischémique.....	37
3.2.4.2.	Rôle des neurotransmetteurs dans la cascade ischémique.....	40
3.3.	Inflammation.....	41
3.3.1.	Dérivés de l'acide arachidonique.....	41
3.3.2.	Cytokines.....	41
3.4.	Reperfusion et production de radicaux libres.....	43
3.5.	Conclusion.....	44

CHAPITRE 4. HYPOXIE APRÈS ISCHÉMIE CÉRÉBRALE AIGÜE.....

4.1.	Introduction.....	45
4.2.	Mécanismes de détection de l'oxygène et hypoxie post-ischémique.....	46
4.2.1.	Le facteur induit par l'hypoxie-1 (HIF-1).....	47
4.2.1.1	Processus de détection et signalisation de HIF-1.....	47
4.2.1.2.	Le HIF-1 dans l'ischémie cérébrale.....	50
4.2.2.	Le NADH/NADPH.....	51
4.2.2.1.	Mécanisme de production d'anions superoxydes.....	52
4.2.2.2.	Le NADPH dans l'ischémie cérébrale.....	53
4.2.3.	Les mitochondries.....	53

4.2.3.1.	Mécanisme de détection de l'oxygène par les mitochondries.....	54
4.2.3.2.	Les mitochondries dans l'ischémie cérébrale.....	54
4.2.4.	Le cytochrome P ₄₅₀	55
4.3.	Observations cliniques des cas d'hypoxémie chez les victimes d'AVC : causes possibles.....	56
4.4.	Distinctions entre hypoxie systémique intermittente et hypoxie systémique chronique.....	58
4.4.1.	Effets d'une hypoxie systémique intermittente.....	58
4.4.2.	Effets d'une hypoxie systémique soutenue.....	60
4.5.	Effets de l'hypoxémie sur les globules rouges, la tension artérielle pulmonaire, et le poids corporel	61
4.6.	Effets de l'hypoxémie sur le système sympathique.....	62
4.7.	Effets de l'hypoxémie sur l'inflammation.....	62
4.8.	Effets de l'hypoxémie sur la transmission synaptique.....	63
4.9.	Effets de l'hypoxémie sur l'expression des enzymes du cytochrome P ₄₅₀	63
4.10.	Effets bénéfiques d'épisodes non létaux d'hypoxie pour la tolérance ischémique.....	64
4.11.	Suivi médical et traitement de l'hypoxie systémique.....	65
4.12.	Conclusion.....	66

CHAPITRE 5. ÉRYTHROPOÏÉTINE ET ÉRYTHROPOÏÈSE APRÈS ISCHÉMIE CÉRÉBRALE AIGUË.....

5.1.	Introduction.....	67
5.2.	Le récepteur de l'EPO.....	67
5.3.	Sources de l'EPO.....	70
5.4.	Régulation de l'EPO.....	71
5.4.1.	Rôle d'une protéine hémiq... ..	71
5.4.2.	Rôle de l'adénosine.....	72
5.4.3.	Voies de signalisation additionnelles impliquées dans l'expression de l'EPO.....	73
5.4.4.	Cinétique de l'expression de l'EPO dans différents organes.....	75

5.5.	L'EPO dans l'inflammation.....	77
5.6.	L'EPO dans l'ischémie cérébrale.....	78
5.6.1.	Neuroprotection par l'EPO <i>in vitro</i>	80
5.6.2.	Neuroprotection par l'EPO <i>in vivo</i>	80
5.6.3.	Rôle de l'EPO dans la tolérance ischémique.....	81
5.7.	L'EPO dans le traitement de l'AVC.....	82
5.8.	L'EPO dans l'érythropoïèse.....	83
5.8.1.	Facteurs intervenant dans la régulation de l'érythropoïèse.....	84
5.8.2.	Effets de l'hypoxie sur l'érythropoïèse.....	86
5.8.3.	Effets d'une augmentation de l'érythropoïèse consécutive à une hypoxie	87
5.8.4.	Effets de valeurs élevées d'hématocrite après ischémie cérébrale aiguë...	87
5.9.	Conclusion.....	88

CHAPITRE 6. RÔLE DES CELLULES ET DES CYTOKINES

INFLAMMATOIRES EN RÉPONSE À L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE

AIGUË.....	89	
6.1.	Introduction.....	89
6.2.	Réponse cellulaire après ischémie cérébrale aiguë.....	90
6.2.1.	Microglie, macrophages et astrocytes.....	90
6.2.1.1.	Microglie et macrophages.....	91
6.2.1.2.	Astrocytes.....	93
6.2.1.3.	Observations histopathologiques de la microglie et des macrophages chez l'humain après ischémie cérébrale aiguë.....	94
6.2.2.	Infiltration des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et des lymphocytes T après ischémie cérébrale aiguë.....	95
6.2.3.	Rôle des sélectines et des intégrines dans l'infiltration des leucocytes après ischémie cérébrale aiguë.....	97
6.3.	Rôle des cytokines dans la réponse à l'ischémie cérébrale aiguë.....	100
6.3.1.	Séquence des évènements impliqués dans la synthèse des cytokines inflammatoires après AVC.....	101
6.3.2.	Interleukine-1 (IL-1) et antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1ra).....	102

6.3.3.	Interleukine 6 (IL-6).....	104
6.3.4.	Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α).....	105
6.3.5.	Hypoxie et cytokines.....	106
6.3.6.	Autres marqueurs périphériques de l'inflammation post-ischémique.....	107
6.4.	Conclusion.....	108

CHAPITRE 7. INTERACTIONS NEUROIMMUNES DANS L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE AIGUË.....

109

7.1.	Communication bidirectionnelle entre le SNC et le système immunitaire	109
7.1.1.	Rôle des hormones dans la réponse neuroimmune.....	110
7.1.2.	Rôle du système nerveux autonome sympathique dans la communication bidirectionnelle entre le SNC et le système immunitaire.....	111
7.2.	Latéralisation cérébrale et conséquence de l'AVC sur le système nerveux sympathique.....	113
7.3.	Latéralisation cérébrale, préférence manuelle et immunité.....	114
7.4.	Lésions corticales et latéralisation de la réponse immune chez les animaux.....	115
7.5.	Lésions corticales et latéralisation de la réponse neuroimmune systémique chez les humains.....	117
7.6.	Impact des lésions sous-corticales du cerveau sur la réponse immune chez les animaux.....	117
7.7.	Latéralisation de la réponse immune chez les patients avec un AVC.....	118
7.8.	Conclusion.....	119

DEUXIÈME PARTIE: CONTRIBUTION ORIGINALE

BUT ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	122
---	------------

CHAPITRE 8. MANUSCRIT I: TRANSIENT MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION INFLUENCE ON SYSTEMIC OXYGEN HOMEOSTASIS AND ERYTHROPOIESIS IN WISTAR RATS.....	124
Acknowledgments.....	126
Abstract.....	128
Introduction.....	129
Materials and Methods.....	130
Animals.....	130
Transient MCAO.....	130
Experiment 1 : Blood Gases, Plasma Epo, and Hematological Changes During the First 24 Hours After Reperfusion.....	131
Experiment 2: Hematological Changes 0 to 28 days After Reperfusion.....	131
Statistical Analysis.....	131
Results.....	131
Effect of MCAO on Blood Gases After Reperfusion.....	133
Effect of MCAO on Peripheral Epo Production and Hematological Parameters After reperfusion.....	133
Effect of MCAO on Hematological Parameters 0 to 28 days After Reperfusion.....	133
Discussion.....	135
References.....	137
Table 1.....	141
Table 2.....	142
Figure Legends.....	143
Figure 1	144
Figure 2.....	145
Figure 3.....	146
Figure 4.....	147

CHAPITRE 9. MANUSCRIT II: SYSTEMIC HYPOXIA AND THE INFLAMMATORY RESPONSE AFTER TRANSIENT CEREBRAL ISCHEMIA IN WISTAR RATS.....	149
Summary.....	150
Introduction.....	151
Materials and Methods.....	151
Results.....	152
Conclusions.....	152
References.....	153
Figure Legend.....	153
Figure 1.....	154
CHAPITRE 10. MANUSCRIT III: TEMPORAL EFFECTS OF LEFT VERSUS RIGHT MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION ON SPLEEN LYMPHOCYTE SUBSETS AND MITOGENIC RESPONSE IN WISTAR RATS.....	156
Acknowledgements.....	157
Abstract.....	158
Introduction.....	159
Materials and methods.....	161
Chemicals.....	161
Animals and experimental design.....	161
Neurological assessment.....	163
High-performance liquid chromatography determination of NE in plasma.....	163
Immunophenotyping of spleen cells.....	164
Mitogen assays.....	165
Statistical analysis.....	165
Results.....	166
Physiological parameters and plasma NE levels.....	166

Infarct volume and neurological deficits.....	166
Effects of MCA occlusion on spleen cell number and subsets, and on mitogen-stimulated T and B lymphocyte proliferation.....	167
Discussion.....	168
References.....	174
Table 1.....	180
Table 2.....	181
Table 3.....	182
Table 4.....	183
Table 5.....	184
Table 6.....	185
Figure Legends.....	186
Figure 1.....	187
Figure 2.....	188
Figure 3.....	189
Figure 4.....	190

TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION GÉNÉRALE

CHAPITRE 11. DISCUSSION GÉNÉRALE..... 191

11.1. Évaluations physiologiques, histologiques et neurologiques à court et à long terme dans notre modèle animal d'AVC ischémique.....	192
11.2. Démonstration de l'hypoxémie induite par l'ischémie cérébrale aiguë chez le rat.....	195
11.3. Érythropoïétine et érythropoïèse après ischémie cérébrale.....	198
11.4. Expression des cytokines pro-inflammatoires dans l'hémisphère cérébrale ischémique, le sang et la rate.....	200
11.5. Effets de l'occlusion temporaire de l'ACM sur les globules blancs dans le sang et la rate.....	202
11.6. Absence d'asymétrie fonctionnelle des effets de l'AVC sur le système immunitaire.....	205

11.7.	Absence d'asymétrie fonctionnelle des effets de l'AVC sur le système nerveux autonome.....	207
11.8.	Limites de cette étude.....	209
11.9.	Conclusion et perspectives futures.....	209
	BIBLIOGRAPHIE.....	212

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Facteurs de risque d'un premier AVC ischémique aigu.....	11
Tableau II	Conditions à remplir pour qu'un composé passe à l'étape des essais cliniques.....	27
Tableau III	Effets pro- et anti-inflammatoires des cytokines IL-1 β , TNF- α et IL-6 dans différents modèles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	103
Tableau IV	Effet de lésions électrolytiques bilatérales sur les paramètres immunitaires.....	118

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Diagramme anatomique des vaisseaux sanguins cérébraux chez l'humain.....	4
Figure 2	Diagramme schématique de la cascade ischémique et utilisation d'agents neuroprotecteurs interférant au niveau des mécanismes impliqués dans la mort neuronale.....	14
Figure 3	Diagramme anatomique des vaisseaux cérébraux chez le rat.....	22
Figure 4	Imagerie de la zone centrale d'ischémie et pénombre ischémique.....	30
Figure 5	Mécanismes présumés de la mort neuronale après l'apparition d'une ischémie cérébrale aiguë.....	34
Figure 6	Diagramme schématique illustrant les récepteurs ioniques pré- et post-synaptiques.....	39
Figure 7	Processus d'adaptation à l'hypoxie.....	48
Figure 8	Modèle d'hypoxie de cellules sensibles à l'oxygène.....	49
Figure 9	Production de radicaux superoxyde à partir du NADPH.....	52
Figure 10	Activation du récepteur de l'EPO.....	69
Figure 11	Modèle intégrant les protéines kinases A et C et la phospholipase A2 dans la régulation hypoxique de la production d'EPO.....	73
Figure 12	Rôle de la PI ₃ K/AKT dans l'expression de l'EPO.....	75
Figure 13	Les facteurs de croissance ayant une influence sur l'érythropoïèse, de la cellule souche pluripotente à l'érythrocyte mature.....	85
Figure 14	Transport des leukocytes du sang vers les tissus.....	98
Figure 15	Diagramme schématique des voies de communication entre le système nerveux central et immunitaire.....	111

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AVC	Accident vasculaire cérébral
ACA	Artère cérébrale antérieure
ACM	Artère cérébrale moyenne Middle Cerebral Artery)
ACTH	Hormone adrénocorticotrope
AIT	Accident ischémique transitoire
AKT	Kinase anti-apoptotique
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate
AP-1	Protéine activatrice-1
ARN	Acide ribonucléique
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adénosine-triphosphate
BCG	Bacille Calmette-Guerin
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
CO	Monoxyde de carbone
CRH	Corticotrophine
DAG	Diacylglycérol
DSC	Débit sanguin cérébral
EAE	Encéphalomyélite allergique expérimentale
EPO	Èrythropoïétine
EPOh	EPO recombinante
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes (Fibroblast Growth Factor)
FMRI	Imagerie fonctionnelle par résonance magnétique
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HHS	Hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HIF-1	Facteur induit par l'hypoxie
HRE	Hypoxic Response Element
I κ B	Sous-unité inhibitrice κ B
ICAM	Molécule d'adhérence intercellulaire-1

IP ₃	Inositol triphosphate
IST	International Stroke Trial
K/Q	Kainate/Quisqualate
LT	Leucotriènes
MAPK	Protéine kinase active par les mitogènes
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
MRI	Imagerie par résonance magnétique
NA	Noradrénaline
NADPH	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	Oxyde nitrique
NOS	NO-synthase
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4	Neurotrophin-4/5
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OH [•]	Radicaux hydroxyle
PaCO ₂	Pression partielle du gaz carbonique
PAF	Facteur d'activation des plaquettes (Platelet Activator Factor)
PaO ₂	Pression partielle de l'oxygène
PC	Phosphocréatine
PG	Prostaglandines
PI ₃ K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol biphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLA ₂	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RtPA	Activateur tissulaire du plasminogène recombinant
SaO ₂	Saturation en oxygène
SCF	Facteur des cellules souches

SH2	Src Homology Domain 2
SHR	Rat avec hypertension spontanée (Spontaneous Hypertensive Rat)
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxyde dismutase
TX	Thromboxanes
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

REMERCIEMENTS

La réalisation de cette thèse a été possible grâce à la collaboration de près ou de loin de plusieurs personnes. Je tiens à les remercier très sincèrement :

Docteur Édouard Kouassi, directeur de recherche, de m'avoir guidé pour ce projet, de sa patience et de son encouragement constant;

Docteurs Patrick du Souich et Jeanne Teitelbaum, codirecteur et codirectrice de recherche, pour leurs précieux conseils lors de l'élaboration et du suivi du projet de recherche et lors de la révision de nos articles;

Chantal Cossette, Stephen Nuara, David Geadah, Ousmane Diallo et Giovanni D'Angelo pour leur aide et apport technique lors des expérimentations;

Les Instituts de Recherche en Santé du Canada et la compagnie AstraZeneca Canada pour leurs généreuses contributions financières à la réalisation de ce projet.

Finalement, je voudrais remercier mon épouse Diane, mes enfants, Marc-André et Alexandre pour leur patience, leur compréhension de tous les instants et leur encouragement constant et leur appui sans condition.

*À mon épouse et mes enfants
Merci pour votre patience*

*À mes défunts parents qui m'ont permis de réaliser
mes rêves ainsi qu'à mes frères et sœurs de m'avoir
soutenu tout au long de ce programme de doctorat.*

PREMIÈRE PARTIE
REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1

L'ACCIDENT VASCULAIRE CÉRÉBRAL

1.1. Introduction

L'accident vasculaire cérébral (AVC), aussi appelé accident cérébrovasculaire ou «attaque cérébrale», est le trouble neurologique dévastateur le plus courant et la troisième cause de mortalité dans les pays industrialisés, après les maladies cardiaques et les cancers (Sacco et al., 1997). Même si notre compréhension des mécanismes sous-jacents des AVC s'est améliorée, leur prise en charge n'est toujours pas optimale et reste l'objet d'un débat. Quelle que soit la mesure utilisée, les AVC sont un énorme problème de santé publique. En plus de la mortalité et de la morbidité qui leur sont associées, leur coût total dépasserait 30 milliards de dollars par année aux États-Unis (Matchar, 1998; Taylor et al., 1996). Chaque année, près de 50 000 Canadiens ont un AVC. Globalement, environ 20 % des patients ayant un premier AVC en meurent dans le mois qui suit (létalité précoce) et, parmi ceux qui sont encore en vie six mois plus tard, à peu près un tiers sont en perte d'autonomie. Le taux de récurrence est d'environ 5 % par année, mais il a tendance à être plus élevé au cours des premiers mois, surtout si l'AVC était dû à une sténose carotidienne (The MRC European Carotid Surgery Trial, 1998; Warlow et al., 1996). De plus, comme les survivants d'un AVC sont habituellement atteints d'une maladie vasculaire touchant tous leurs systèmes artériels et pas seulement la circulation cérébrale, ils sont exposés à un risque élevé d'accident coronarien grave – environ 3 % par année (Warlow et al., 1996). Les diverses facettes du fardeau des AVC comprennent donc la mortalité, l'incidence, la prévalence, l'évolution à long terme et le coût, qui sont tous élevés.

Un AVC est un syndrome clinique d'apparition rapide traduisant une perte focale de fonction cérébrale ayant pour seule cause apparente une origine vasculaire, quoique la perte de fonction soit parfois générale. Les symptômes durent plus de 24 heures ou causent le décès (Warlow et al., 1996). La gravité du syndrome est variable, allant d'une récupération complète en une journée au décès du patient en passant par une récupération incomplète et une incapacité marquée. De nombreux patients devenus invalides considèrent que leur sort est pire que la mort (Shuaib, 1999).

Comme d'autres syndromes cliniques, tels que la pneumonie ou la méningite, les AVC sont très hétérogènes et leurs nombreuses causes influencent le pronostic, le type de traitement nécessaire et les stratégies de prévention. La prévention et le traitement des AVC sont des préoccupations cruciales de santé publique. Les récents progrès effectués dans la compréhension des causes des AVC nous permettent maintenant de les prévenir.

L'introduction du traitement thrombolytique des AVC aigus a changé radicalement le pronostic et a permis d'envisager un traitement d'urgence analogue à celui de la coronaropathie. L'AVC est ainsi devenu une maladie susceptible d'être traitée. Deux systèmes doivent être pris en considération dans le diagnostic et la prise en charge des AVC : le système circulatoire et le système nerveux. Un trouble du système circulatoire déclenche une atteinte de structures cérébrales. Le lieu de l'atteinte cérébrale détermine les symptômes, les signes et l'ampleur de l'incapacité provoquée par l'AVC. L'anatomie et la chimie du cerveau interviennent dans la vulnérabilité des neurones et la propagation des lésions neuronales qui sera discuté au Chapitre 3.

1.2. Anatomie du système circulatoire en jeu dans l'AVC ischémique aigu

Le cerveau inclut de deux hémisphères cérébraux. Leur partie externe, appelée cortex cérébral, entoure de grosses structures profondes : les noyaux basaux incluant le thalamus, les voies ascendantes et descendantes de substance blanche et les ventricules remplis de liquide céphalo-rachidien. Le cortex cérébral est composé des lobes frontal, pariétal, temporal et occipital. Les structures profondes du cerveau sont reliées au tronc cérébral, qui contient le mésencéphale, la protubérance annulaire et le bulbe rachidien. Le cervelet est situé en arrière du tronc cérébral. Chaque hémisphère est irrigué par une artère carotide interne (voir figure 1). Les artères carotides communes droite et gauche naissent respectivement du tronc artériel brachio-céphalique et de la crosse de l'aorte. Elles se divisent dans le cou, juste au-dessous de l'angle de la mâchoire et forment l'artère carotide interne qui irrigue le cerveau et l'artère carotide externe qui irrigue le visage. L'artère carotide interne traverse le rocher et le sinus caverneux et se dirige vers l'œil, où elle donne naissance à l'artère ophtalmique. L'artère choroïdienne antérieure prend son origine de l'artère carotide interne juste avant qu'elle se divise pour créer l'ACM et l'artère cérébrale antérieure. L'artère choroïdienne antérieure pourvoit à la vascularisation du lobe temporal moyen. L'ACM irrigue la surface latérale des hémisphères cérébraux, y compris les lobes frontal, pariétal et temporal. De petites branches du segment horizontal de cette artère, les

artères lenticulo-striées, irriguent les noyaux basaux et la capsule interne, qui est la substance blanche de la principale voie de connexion entre le cortex et les structures profondes (voir figure 1). L'artère cérébrale antérieure (ACA) apporte du sang à la surface moyenne des hémisphères cérébraux, y compris les lobes frontal, pariétal et temporal (voir figure 1). Un réseau considérable d'anastomoses fournissent du sang aux régions du cerveau qui pourraient être privées de leur principale source de sang par l'occlusion d'un vaisseau important.

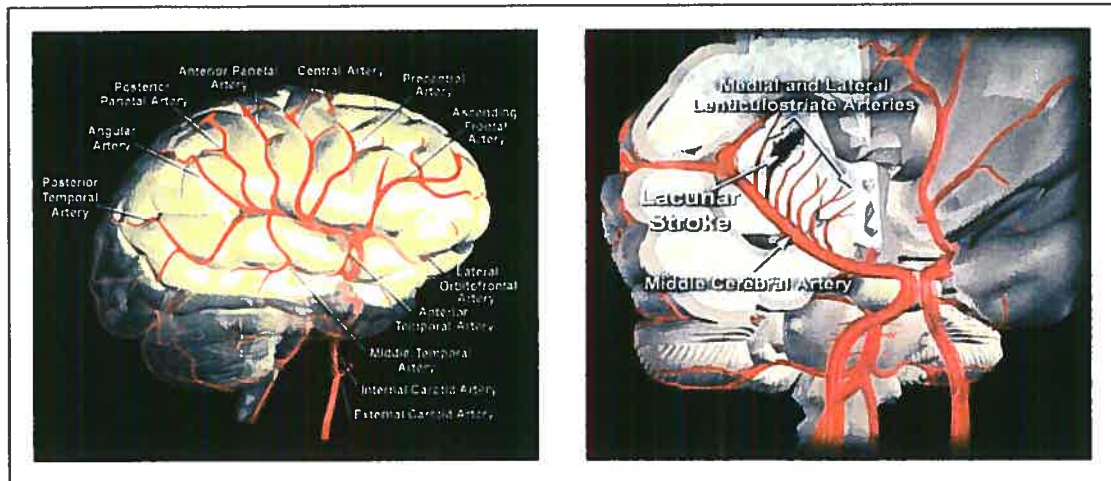


Figure 1. Diagramme anatomique des vaisseaux sanguins cérébraux chez l'humain (Tiré de "The internet stroke centre": www.strokecenter.org; consulté le 01/09/2004)

Le principal système anastomotique est le cercle de Willis (ou polygone de Willis) situé à la base du cerveau. Les deux artères carotides communiquent d'un côté à l'autre par l'artère communicante antérieure.

Chaque artère carotide communique avec l'artère cérébrale postérieure par l'artère communicante postérieure, ce qui permet une circulation de suppléance entre le système carotidien et le système vertébro-basilaire. Des anastomoses peuvent aussi exister entre l'artère carotide externe et l'artère carotide interne, en cas d'occlusion de cette dernière.

Du sang peut couler à contre-courant de la branche sus-orbitaire de l'artère carotide externe à l'artère carotide interne en passant par l'artère ophtalmique, et les branches méningées de l'artère carotide externe peuvent former des anastomoses avec les branches distales des artères cérébrales. Les zones jonctionnelles des territoires artériels du cerveau sont situées à la confluence des branches distales des artères cérébrales, à la jonction des territoires des artères cérébrales moyenne (ACM) et antérieure dans la portion moyenne des

hémisphères et à la jonction des artères cérébrales moyenne et postérieure dans le lobe pariétal postérieur. Ces zones sont plus vulnérables à une ischémie par une chute soudaine de la pression de perfusion.

1.3. Étiologie des AVC

Les deux principales causes d'une atteinte vasculaire cérébrale sont une ischémie et une hémorragie. Environ 85 % des AVC sont d'origine ischémique et 15 %, d'origine hémorragique (Bogousslavsky et al., 1988; Sherman et al., 1995).

1.3.1. AVC ischémique

Un infarctus ischémique se produit quand la perfusion sanguine d'un territoire cérébral est réduite à cause de l'occlusion du vaisseau sanguin qui irrigue ce territoire. Les AVC ischémiques se divisent en AVC thrombotiques sur artère de gros calibre, AVC thrombotiques sur artère de petit calibre, AVC athéro-emboliques par la migration d'un embole d'une grosse artère à une branche distale et en AVC cardio-emboliques (Bogousslavsky et al., 1988; Sherman et al., 1995). L'athérosclérose de vaisseaux extracrâniens, notamment à la bifurcation carotidienne, est responsable d'environ 20 % des AVC ischémiques. Une vasculopathie intracrânienne est responsable d'environ 40 % des AVC ischémiques et une maladie cardio-embolique, de 20 %. La cause ne peut pas être déterminée dans à peu près 20 % des cas, qui sont appelés AVC cryptogéniques.

1.3.1.1. Thrombose intracrânienne

Les AVC ischémiques liés à une vasculopathie intracrânienne concernent habituellement les structures profondes du cerveau, dans la région des noyaux basaux, du thalamus et de la capsule interne. Les petits infarctus appelés lacunes sont causés principalement par la lipohyalinose, une affection caractérisée par des changements prolifératifs des parois artériolaires, qui entraînent une nécrose fibrinoïde et une thrombose des artérioles atteintes (Fisher, 1998). Ces changements prolifératifs sont causés surtout par l'hypertension et le diabète, des facteurs de risques majeurs d'un AVC. Un petit infarctus lacunaire dans une voie cruciale de substance blanche peut causer un déficit neurologique important. En revanche, l'autopsie de patients hypertendus peut révéler de nombreux petits AVC lacunaires qui étaient restés asymptomatiques ou qui n'avaient occasionné que de légers changements cognitifs durant la vie du patient. Une étude chez des sœurs d'une

congrégation a montré que la sévérité et la fréquence des démences chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer étaient plus grande chez les sujets avec des petits infarctus lacunaires démontrant ainsi l'importance des maladies cérébrovasculaires dans la démence (Snowden, 2003; Snowden et al., 1997). Il est d'ailleurs suggéré que dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer, l'angiogénèse et la néovascularisation pathologique peuvent survenir en réponse à une perfusion cérébrale inadéquate et à des lésions vasculaires de type inflammatoire. Ces lésions peuvent mener à des changements morphologiques (densité des capillaires) et biochimiques telle que l'expression des médiateurs inflammatoires VEGF, TGF- β et TNF- α (Gorelick, 2005). De plus, l'athérosclérose et la maladie d'Alzheimer sont intimement liées. Les facteurs communs sont l'inflammation systémique, le syndrome métabolique, le diabète et l'obésité, entre autres. (Casserly et Topol, 2004). Finalement, l'occlusion de vaisseaux intracrâniens de plus gros calibre peut causer des AVC plus étendus. L'athérosclérose des vaisseaux intracrâniens est plus fréquente chez les patients d'origine africaine ou asiatique que chez ceux de race blanche (Caplan et al., 1986).

1.3.1.2. Athérosclérose extracrânienne

L'athérosclérose à la bifurcation carotidienne peut causer un AVC par embolisation interartérielle ou par thrombose aiguë avec réduction de la perfusion distale. L'athérosclérose est caractérisée par un épaissement de l'intima causé par des macrophages chargés de lipides (Fuster, 1996). Ces lésions se produisent aux points de déviation ou de division des artères à cause des forces de cisaillement. La paroi postérieure de la bifurcation carotidienne, du côté opposé où naît l'artère carotide externe, est le principal lieu où l'on trouve des plaques athéroscléreuses en raison de turbulences accompagnées de remous et de contre-courants occasionnant l'accumulation de matériel lipidique. Une plaque se forme quand des macrophages et des lipides extracellulaires prolifèrent dans la région d'une strie lipidique (Zarins et al., 1983) et croissent avec la prolifération de cellules musculaires lisses stimulées par le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance des plaquettes (PGF) et l'angiotensine II (O'Brien et Schwartz, 1996). Il peut y avoir une accumulation extracellulaire de lipides avec une composante cellulaire confluyente ou encore une concentration de lipides en un noyau central entouré d'une mince chape fibreuse. Ces plaques peuvent se rompre et causer une hémorragie à l'intérieur de la plaque. Dans les artères, cette rupture peut donner lieu à

une occlusion du vaisseau même si la plaque initiale ne produisait pas une sténose notable (Fuster, 1996). Une occlusion dans les artères peut aussi se produire quand du collagène s'accumule dans la plaque après la formation d'un thrombus et entraîne un épaissement de la paroi par fibrose pouvant donner lieu à une occlusion (Fuster, 1996). Les symptômes des AVC et des accidents ischémiques transitoires (AIT) associés à une athérosclérose carotidienne se produisent surtout au moment d'une rupture de plaque aiguë et d'une hémorragie dans la plaque, à cause de la formation d'embolies qui viennent obstruées des branches intracrâniennes distales ou l'artère carotide interne (Imparato et al., 1979; Imparato et al., 1983; Lusby et al., 1982).

1.3.1.3. AVC cardio-embolique

Un AVC cardio-embolique produit habituellement un infarctus dans les vaisseaux intracrâniens distaux du cortex cérébral (Easton et Sherman, 1980). À l'examen anatomopathologique, la plupart des occlusions de l'ACM se révèlent être d'origine cardio-embolique (Lhermitte et al., 1970). La principale cause d'embolie cardiogène est la fibrillation auriculaire. La fibrillation auriculaire accompagnée d'une cardiopathie rhumatismale valvulaire multiplie par 17 le risque d'AVC par rapport à un groupe témoin apparié (Wolf et al., 1978). La fibrillation auriculaire non valvulaire est beaucoup plus fréquente, notamment chez les personnes de plus de 75 ans, et elle multiplie par six le risque d'AVC par rapport à un groupe témoin apparié (Wolf et al., 1978). Un AVC embolique peut aussi être associé à un infarctus aigu du myocarde (Easton et Sherman, 1980), en particulier quand il intéresse la paroi antérieure du cœur (Asinger et al., 1981). Le risque commence environ 48 heures après l'infarctus et persiste pendant à peu près six mois, après quoi la paroi lésée du myocarde devient akinétique et moins susceptible de causer un embolie à partir d'un thrombus (Asinger et al., 1981). D'autres causes d'infarctus cérébraux emboliques sont : (1) un prolapsus valvulaire mitral (Barnett et al., 1980; Jeanrenaud et al., 1990), qui survient chez jusqu'à 10 % de la population générale, (2) une endocardite bactérienne, aiguë ou subaiguë (Kanter et Hart, 1991), (3) des prothèses valvulaires chez des patients non infectés, (4) la calcification de l'anneau mitral et des anévrysmes du septum interauriculaire, (5) une plaque athéroscléreuse dans la crosse de l'aorte (Tunick et Kronzon, 1990).

1.3.1.4. Anomalies hématologiques et de la coagulation

Des anomalies hématologiques et des coagulopathies augmentent le risque d'apparition d'un AVC ischémique. La polycythémie (ou polyglobulie), par exemple, augmente ce risque par le biais d'une hyperviscosité du sang ou d'une augmentation de l'activité plaquettaire causant une thrombose (Kannel et al., 1972; Tohgi et al., 1978). Les AVC peuvent être associés à des carences de certaines protéines anticoagulantes, comme l'antithrombine III, la protéine C et la protéine S (D'Angelo et al., 1988; Kohler et al., 1990). L'hyperagrégabilité plaquettaire entraîne une thrombose intracrânienne dans le purpura thrombocytopénique thrombotique, qui peut aussi occasionner une hémorragie intracrânienne par déplétion plaquettaire (Silverstein, 1968). La présence d'anticorps anticardioline ou d'anticorps antiphospholipides sans autre manifestation d'une collagénose vasculaire est un facteur de risque indépendant notable d'un AVC, tout autant que l'hypertension et le diabète (The Antiphospholipid antibodies in stroke study (APASS) group, 1993). La drépanocytose est associée à une vasculopathie intra- ou extra-crânienne causée par l'épaississement des drépanocytes dans la paroi artérielle, ce qui donne lieu à une thrombose (Russell et al., 1984). Le diabète est associé à une hyperagrégabilité plaquettaire et à une hypercoagulabilité sérique, qui peuvent contribuer à un AVC (Mayne et al., 1970).

1.3.2. AVC hémorragique

Un AVC hémorragique est causé par la rupture d'un vaisseau sanguin qui irrigue le cerveau. Les gros vaisseaux sanguins à destinée cérébrale traversent l'espace sous-arachnoïdien (espace entre la pie-mère et l'arachnoïde). Les artéioles pénètrent dans le parenchyme cérébral et irriguent les structures du système nerveux central. Les hémorragies qui résultent de la rupture d'artéioles intracrâniennes, sont intra-parenchymateuses dans 75 % des cas, et sous-arachnoïdiennes dans 25 %.

1.3.2.1. Hémorragie cérébrale parenchymateuse

L'étiologie de base est l'hypertension qui provoque la formation de microanévrismes sur les parois des artéioles lésées par une lipohyalinose (Cole et Yates, 1967). Lors de rupture de ces microanévrismes, une hémorragie intraparenchymateuse se produit habituellement dans les structures profondes du cerveau, dans la région des noyaux

basaux. Une hémorragie lobaire peut aussi résulter de l'hypertension, mais elle est souvent causée par une angiopathie amyloïde, en particulier chez la personne âgée (Vinters, 1998).

1.3.2.2. Hémorragie sous-arachnoïdienne

Les hémorragies sous-arachnoïdiennes sont causées le plus souvent par la rupture d'anévrismes sacculaires aux points de division des artères intracrâniennes au niveau du polygone de Willis. Les anévrismes sont donc retrouvés le plus souvent au niveau de l'origine des artères communicantes postérieures, communicantes antérieures et cérébrales moyennes et de la basilaire. Des malformations artério-veineuses qui permettent au sang de passer directement d'artères cérébrales à des veines sans passer par un lit capillaire peuvent aussi causer une hémorragie sous-arachnoïdienne avec ou sans composante intraparenchymateuse.

1.3.2.3. Hémorragies sous-durale et epidural

Contrairement aux hémorragies cérébrales et sous-arachnoïdiennes, les hématomes sous-duraux sont associés à un processus externe tel un trauma ou une accélération/décélération de la tête. L'hématome sous-dural est le grand imitateur, et peut se présenter avec des signes latéralisateurs comme un AVC, une céphalée isolée, ou une atteinte de l'état de conscience et hypertension intracrânienne. L'hématome sous-sural est plus fréquent chez le sujet avec une atrophie cérébrale ou coagulopathie (alcool, anticoagulants, thrombocytopénie et autres). Dans les modèles animaux, l'hématome sous-durale peut induire une ischémie dans le cortex sous-jacent (Miller et al., 1990). Après un traumatisme crânien, l'hématome se forme graduellement pendant des jours ou même des semaines. Avec un diagnostic précoce et une évacuation si nécessaire, ils guérissent souvent sans séquelles.

L'hématome épidurale survient presque toujours après un trauma cranien, souvent en relation à une fracture du crane. Elle est causée par la déchirure de l'artère méningée moyenne. Classiquement, le sujet aura une perte de connaissance transitoire après l'accident puis semblera revenir à son niveau de base. Quelques heures plus tard, il y aura une atteinte rapidement progressive de l'état de conscience allant au coma. S'il n'y a pas une intervention rapide pour arrêter l'hémorragie et drainer l'hématome, le sujet meurt.

1.4. Facteurs de risque des AVC

Même si des traitements visant à réduire les lésions cérébrales dues à un AVC aigu sont en voie de développement, la prévention reste la stratégie la plus efficace pour réduire les coûts des AVC et leurs conséquences sur la santé. Des études épidémiologiques prospectives ont permis d'établir des facteurs de risque individuels et environnementaux des AVC et leur importance relative. Ces facteurs de risque peuvent être répartis en facteurs modifiables et en facteurs non modifiables. En prêtant suffisamment d'attention aux facteurs de risque modifiables, on peut réduire dans une grande mesure l'effet des facteurs non modifiables.

1.4.1. Facteurs de risque non modifiables des AVC

L'âge, le sexe, la race et les antécédents familiaux d'AVC ou d'AIT sont des facteurs de risque non modifiables (Sacco et al., 1997). Le risque de faire un AVC augmente avec l'âge. Deux tiers des AVC se produisent chez des personnes de plus de 65 ans. Passé l'âge de 55 ans, le risque d'AVC double tous les 10 ans (The National Stroke Association, 1995). Les hommes risquent un peu plus que les femmes d'avoir un AVC. Par contre, comme les femmes vivent plus longtemps, plus de survivants d'un AVC âgés de plus de 65 ans sont des femmes. Les Afro-Américains sont exposés à un risque plus élevé que la plupart des autres groupes raciaux (Broderick et al., 1998; Sacco et al., 1998; The American Heart Association, 1995), sauf ceux de plus de 75 ans (Broderick et al., 1998). Par ailleurs, le risque d'un AVC est plus élevé chez les personnes ayant des antécédents familiaux d'AVC ou d'AIT (Kiely et al., 1993). Le diabète augmente le risque d'AVC, peut-être en raison des problèmes circulatoires qu'il peut causer. De plus, l'atteinte cérébrale peut être plus grave et plus étendue si la glycémie est élevée au moment de l'AVC. Le traitement du diabète peut retarder l'apparition de complications qui augmentent le risque d'AVC. Toutefois, même quand la glycémie est bien contrôlée par un traitement, les personnes diabétiques sont peut-être exposées à un risque accru du simple fait d'être diabétiques.

1.4.2. Facteurs de risque modifiables et prévention primaire des AVC

Plusieurs facteurs modifiables semblent influencer le risque d'AVC. Les facteurs associés au risque attribuable (paramètre reflétant le risque relatif et la prévalence générale) le plus élevé semblent être les meilleures cibles pour la prévention des AVC. Le tableau I

énumère les facteurs de risque pour lesquels il est démontré qu'ils valent la peine d'être modifiés.

Tableau I. Facteurs de risque d'un premier AVC ischémique (Easton, 1998.)

Facteurs non modifiables	Facteurs modifiables
Âge	Hypertension
Sexe	Diabète
Race ou origine ethnique	Fibrillation auriculaire
Hérédité	Tabagisme
	Hypercholestérolémie
	Forte consommation d'alcool
	Sténose carotidienne asymptomatique
	Accident ischémique transitoire

La prévention primaire de l'accident vasculaire cérébral passe par la modification des facteurs de risque, soit en effectuant des changements dans les habitudes de vie ou en intervenant sur le plan médical. Les résultats provenant des essais cliniques indiquent que l'AVC peut être prévenu et que le risque de récurrence d'un AVC peut être réduit (Wolf, 1998). Les mesures de prévention incluent notamment: (1) le contrôle de l'hypertension par des agents anti-hypertenseurs comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui semblent les plus avantageux dans la prévention des AVC (Hosomi et al., 2001; The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, 2000), (2) l'arrêt de l'usage du tabac (Wannamethee et al., 1995), (3) la diminution de la consommation d'alcool (Sacco et al., 1999), (4) l'augmentation de l'activité physique chez les personnes sédentaires, (5) l'utilisation d'anticoagulant chez les patients avec fibrillation auriculaire (The Stroke Prevention in Atrial Fibrillation III randomised clinical trial, 1996), (6) l'utilisation d'antiplaquettaires après un AVC ou une ischémie cérébrale transitoire d'origine athérombotique (Wolf, 1998), (7) l'utilisation d'agents hypolipidémiques telles que les statines qui ont réduit l'incidence d'AVC de 31% chez les patients avec athérosclérose et hypercholestérolémie (Hébert et al., 1997, et finalement (8) le contrôle serré de la glycémie chez les patients diabétiques (Wolf, 1998).

1.5. Traitement d'un AVC aigu

Deux approches ont été développées pour la thérapie de l'AVC. La première approche consiste à dissoudre rapidement les caillots à l'origine de l'ACV et à restaurer la libre circulation du sang dans le but de limiter les dommages causés au cerveau. La deuxième approche consiste notamment dans l'utilisation d'agents neuroprotecteurs qui interfèrent avec la cascade d'évènements biochimiques qui mènent à la mort neuronale.

1.5.1. Reperfusion

Une ischémie cérébrale est causée soit par l'occlusion d'un vaisseau qui irrigue un territoire du cerveau, soit par une insuffisance circulatoire générale due à un arrêt cardiaque et à une hypotension générale. Le traitement optimal est la reperfusion en reperméabilisant l'artère occluse, en contournant l'oblitération ou en rétablissant le débit cardiaque et la pression de perfusion globale. Un seul traitement est présentement approuvé au Canada pour reperméabiliser un vaisseau occlu par un caillot. Ce thrombolytique, l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA), doit être administré moins de trois heures après le début des symptômes, avant que le territoire cérébral irrigué par l'artère occluse soit complètement infarci. Malheureusement, la plupart des patients n'arrivent pas à l'hôpital assez tôt pour le recevoir (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Aussi, ce traitement n'est pas sans risque et s'accompagne de 5 à 10 % de risques d'hémorragie intracrânienne sérieuse ou de décès (Katzan et al., 2000). Des techniques avancées d'imagerie cérébrale et vasculaire permettent, cependant, de mieux choisir les patients en déterminant la présence d'un infarctus, la quantité de tissu cérébral déjà infarci ou menacé par l'hypoperfusion ainsi que la présence et le lieu de thrombus ou d'embolies occlusifs. L'échographie doppler transcrânienne permet de détecter des thrombo-embolies intracrâniennes et de faciliter peut-être la thrombolyse. Cette technique peut servir aussi à déterminer s'il y a eu recanalisation.

Des inhibiteurs de la glycoprotéine plaquettaire IIb/IIIa ont été administrés à la place du rt-PA ou après ce dernier pour faciliter la thrombolyse et prévenir la formation de thrombus blancs. Des moyens mécaniques d'extraction de caillots sont aussi à l'étude (Bellon et al., 2001). Quand un patient présente un thrombus aigu greffé à une lésion athérosténosique avancée, il faut souvent procéder à une angioplastie, avec ou sans mise en place d'une endoprothèse, pour prévenir la rethrombose après une thrombolyse efficace.

1.5.2. Augmentation de la perfusion des territoires ischémiques

D'après des constatations préliminaires, on pourrait réduire l'étendue d'un infarctus cérébral, en augmentant la pression de perfusion cérébrale des patients présentant les premiers symptômes d'un AVC, en prévenant l'hypotension et l'hypovolémie. L'hypovolémie est un problème potentiel chez les patients atteints d'AVC aigu qui ne peuvent souvent pas s'hydrater oralement. De plus, quelques études ont regardé le bénéfice potentiel d'une augmentation thérapeutique de la pression artérielle pour optimiser la pression de perfusion cérébrale. On peut augmenter substantiellement la circulation dans les artères collatérales en maximisant la volémie, en optimisant la tension artérielle et en maintenant la tête à l'horizontale.

1.5.3. Utilisation des anticoagulants et des antiplaquettaires dans le traitement aigu de l'AVC

Dans l'étude TOAST (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment) (The Publications Committee for the Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Investigators, 1998), un héparinoïde s'est avéré efficace pour réduire la fréquence de résultats défavorables dans un sous-groupe de patients atteints d'AVC avec sténose ou une occlusion athérosclérotique documentée d'une artère de gros calibre. L'aspirine a un faible effet positif sur l'évolution d'un AVC aigu et cet effet est statistiquement significatif. (The International Stroke Trial Collaborative Group, 1997). Les médicaments intraveineux comme l'abciximab sont parfois efficaces dans les cas de réocclusion après une thrombolyse efficace et leur effet thrombolytique a été mis en évidence à l'occasion (Lapchak et Araujo., 2003). L'Ancrod et l'estérase d'arginine ont un pouvoir fibrinolytique impressionnant et, d'après des données préliminaires, pourraient être efficaces dans certaines circonstances (Sherman, 2002). La fibrine intervient dans la formation et le maintien des thrombus rouges (érythrocytes-fibrine) et des thrombus blancs (plaquettes-fibrine). Diminuer le taux de fibrinogène réduirait la viscosité et améliorerait l'apport sanguin dans les zones ischémisées. Même si cette stratégie a reçu beaucoup d'attention dans le passé, malheureusement aucun des rapports d'essais terminés ne contient une analyse détaillée des types d'AVC et des lésions vasculaires déterminées par des techniques modernes d'imagerie cérébrale et vasculaire.

Malgré quelques études prometteuses (Baker, 1962; Duke et al., 1986; Fisher, 1958; Kay et al., 1995) l'anticoagulation immédiate de tout patient atteint d'AVC par de

l'héparine intraveineuse ne s'est pas révélée efficace pour améliorer les résultats dans le cadre d'essais cliniques contrôlés, quel que soit le type d'AVC (Haley et al., 1988; The International Stroke trial collaborative group, 1997).

1.5.4. Les agents neuroprotecteurs

Une bonne compréhension des mécanismes impliqués a permis de mettre au point des médicaments qui limitent ou atténuent l'importance des lésions neuronales. Plusieurs types de médicaments neuroprotecteurs (voir figure 2) existent comme traitement potentiel de l'AVC.

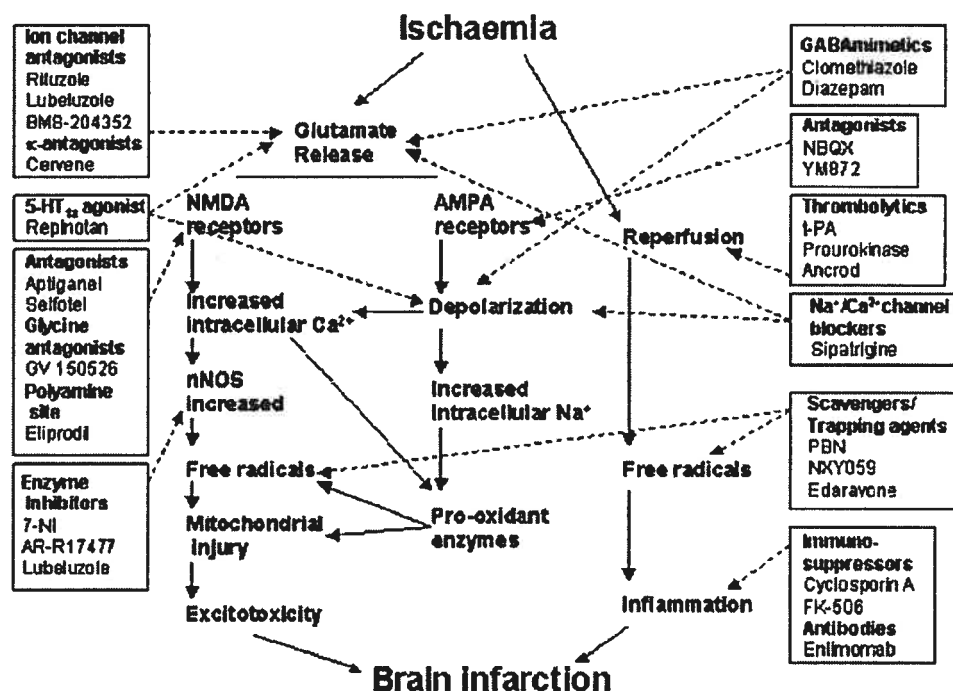


Figure 2. Diagramme schématisé de la cascade ischémique et utilisation d'agents neuroprotecteurs interférant au niveau des mécanismes impliqués dans la mort neuronale (Green et al., 2003a)

Lorsque les agents neuroprotecteurs sont administrés avant l'attaque, ou quelques heures après (étude pré-clinique), ces agents peuvent soit prévenir l'infarctus ou en limiter grandement l'étendue. Un certain nombre de ces agents neuroprotecteurs sont présentement soumis à des essais cliniques portant sur l'accident vasculaire cérébral aigu (Green et al., 2003a). Un avantage de l'utilisation de ces médicaments dans les cas d'accident vasculaire

cérébral aigu est qu'une tomодensitométrie crânienne n'est pas nécessaire avant l'administration de la dose initiale du produit. En outre, l'agent neuroprotecteur pourrait potentiellement être utilisé dans l'ambulance, ce qui permettrait de sauver de précieuses minutes. Aucun médicament neuroprotecteur ne s'est révélé efficace chez l'humain jusqu'à ce jour. Une des barrières probable au succès de l'utilisation des agents neuroprotecteurs est la petite quantité viable de tissu de la pénombre au moment de la présentation des patients avec AVC.

1.6. Prévention secondaire

Plusieurs possibilités thérapeutiques pour la prévention des AVC aigus récurrents s'offrent aux cliniciens. D'abord, il s'agit de bien identifier les facteurs de risque et les maîtriser le mieux possible avec des médicaments appropriés et ensuite d'y ajouter des médicaments connus pour diminuer le risque d'un autre AVC aigu.

Selon des études préliminaires, l'aspirine et d'autres médicaments qui modifient la fonction plaquettaire (comme le clopidogrel ou le dipyridamole à libération prolongée) sont efficaces pour prévenir des AVC aigus récurrents et des infarctus du myocarde, mais les essais réalisés n'ont pas déterminé quel groupe de patients en bénéficiait (Diener et al., 2004; Fox et al., 2004; Jones et al., 2004). Une méta-analyse d'essais randomisés contrôlés d'antiplaquettaires dans la prévention secondaire des AVC a révélé une réduction de 15 % (non significative) des AVC avec l'aspirine comparativement au placebo de même qu'une tendance vers une réduction des AVC pour tout traitement contenant de l'aspirine (Sze et al., 1988). Des essais du chlorhydrate de ticlopidine, du clopidogrel et de l'aspirine en association avec le dipyridamole à libération prolongée ont démontré la supériorité de ces médications comparativement à l'aspirine seule pour réduire les événements vasculaires en général et certains résultats préoccupants reliés aux AVC (Diener et al., 1996). L'aspirine utilisée dans l'étude factorielle IST (International Stroke Trial) n'a démontré aucune différence significative dans la mortalité ou la dépendance fonctionnelle à six mois. Cependant, il y a eu une réduction de mortalité ou de la récurrence non mortelle d'AVC (The International Stroke Trial Collaborative Group, 1997).

Lors de plusieurs essais randomisés, la warfarine a été manifestement efficace pour prévenir un AVC chez des patients atteints de fibrillation auriculaire. La warfarine s'est révélée nettement plus efficace que l'aspirine dans ce groupe de patients (référence). Une étude récente sur la prévention d'un second AVC n'a pas permis d'observer une différence

significative entre l'aspirine et la warfarine dans la prévention d'un second AVC ischémique, du décès ou d'une hémorragie intracrânienne (Mohr et al., 2001).

1.7. Conclusion

L'accident vasculaire cérébral peut s'avérer un défi diagnostique de taille du fait que ses symptômes sont nombreux et variés. Les attaques cérébrales sont en majorité de type ischémique (plus de 80% des cas), et le reste est de type hémorragique. Le mécanisme sous-jacent impliqué dans les attaques ischémiques est soit athérombotique, embolique ou lacunaire. Un traitement préventif des facteurs de risques modifiables tels que hypertension, l'hypercholestérolémie et le diabète, entre autres, et l'arrêt du tabagisme, peuvent s'avérer très bénéfiques. Le traitement des AVC aigus s'appuie maintenant sur des bases scientifiques solides. Les traitements anticoagulants et antiplaquettaires ont des indications précises. La thrombolyse est une nouvelle avenue thérapeutique pour l'AVC aigu. De nouvelles stratégies basées sur les neuroprotecteurs sont en train d'être élaborées pour réduire l'étendue des lésions ischémiques. La stratégie la plus prometteuse semble combiner un traitement thrombolytique visant à rétablir la perfusion cérébrale et un traitement neuroprotecteur, ayant pour but de sauver des neurones ischémiés et de prévenir les lésions de reperfusion. Par ailleurs, l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle a permis d'étudier les aspects qualitatifs, quantitatifs et temporels du rétablissement cérébral, après une ischémie.

CHAPITRE 2

MODÈLES ANIMAUX D'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE AIGUË

2.1. Introduction

Les modèles d'AVC ont fait l'objet d'un débat considérable (Millikan, 1992; Wiebers et al., 1970; Zivin et Grotta, 1990). D'après certains auteurs, la physiopathologie des maladies cérébrovasculaires ischémiques est si complexe et ses causes, ses facteurs de risque et ses manifestations cliniques sont si diverses, qu'il est pratiquement impossible de concevoir un modèle d'AVC qui puisse tenir compte de toutes ces variables. Le succès d'une méthode scientifique dépendra donc de la capacité du chercheur à élaborer une représentation pratique d'événements de la vie réelle qui permette de contrôler précisément les variables indépendantes et les facteurs confondants possibles.

Ainsi, la principale force des modèles d'ischémie cérébrale réside dans leur capacité de fournir une version simplifiée de la maladie humaine, tout en permettant de contrôler certaines variables physiologiques. De plus, comme les résultats expérimentaux doivent être reproductibles, il faut faire des efforts pour produire des AVC dont la gravité est raisonnablement semblable d'un animal à l'autre. L'étude de produits thérapeutiques nécessite aussi un certain degré d'uniformité entre les sujets et les témoins, ce qui est plus faisable dans des modèles animaux conçus avec soin et correctement standardisés.

Comme susmentionné, il existe des modèles animaux d'ischémie cérébrale, mais ils ne reproduisent que certains aspects de la situation clinique. La population des patients souffrant d'un AVC est très hétérogène et de nombreuses variables doivent être prises en considération quand on choisit un modèle animal. Les patients ont des origines ethniques différentes, sont principalement âgés ou d'âge moyen, ont un infarctus de localisation variable, accompagné ou non de reperfusion, sont atteints d'une maladie cérébro- ou cardio-vasculaire sous-jacente et prennent divers médicaments.

Les modèles *in vivo* se répartissent en deux groupes principaux : les modèles d'ischémie globale et les modèles d'ischémie cérébrale focale.

2.2. Modèles d'ischémie cérébrale aiguë globale

Dans les modèles globaux, tout le cerveau est ischémié pendant une courte période de temps (occlusion passagère des vaisseaux sanguins irriguant le cerveau) et le rétablissement de l'animal repose sur une reperfusion générale. Dans ces modèles, les lésions histologiques cérébrales évoluent pendant des jours. On considère que ces modèles produisent des changements physiologiques similaires à ceux qui surviennent après un arrêt cardiaque et un pontage aortocoronarien chez l'humain.

2.2.1. Modèle d'occlusion carotidienne bilatérale chez la gerbille

Le modèle d'occlusion carotidienne bilatérale chez la gerbille est abondamment utilisé parce qu'il est simple à réaliser et relativement peu invasif. Un épisode d'ischémie transitoire est déclenché dans le cerveau de la gerbille par l'occlusion bilatérale de l'artère carotide commune (Crockard et al., 1980). En raison du polygone de Willis incomplet de la gerbille, cette occlusion de deux artères occasionne une ischémie substantielle dans le cerveau antérieur. L'occlusion dure généralement près de cinq minutes, mais elle peut durer jusqu'à 30 minutes. Après une brève période d'occlusion, on observe une neurodégénérescence typique et bien particulière, les gros neurones des aires CA1/CA2 de l'hippocampe étant particulièrement touchés (Brown et al., 1979). Une période d'occlusion plus longue peut entraîner des lésions dans d'autres régions du cerveau, y compris le cortex et le striatum (Baldwin et al., 1993). De plus, la dégénérescence des neurones de l'hippocampe apparaît après une période de 24 heures, durant laquelle aucun changement morphologique n'est manifeste; c'est ce qu'on appelle la «mort neuronale retardée» (Kirino et al., 1984).

Fait à signaler, l'histopathologie des structures affectées par l'AVC chez la gerbille après cet épisode ischémique est similaire à ce qu'on observe dans le cerveau humain après un arrêt cardiaque (Petito et al., 1987; Zola-Morgan et al., 1986), et les structures affectées apparaissent aussi après une période de 24 heures (Petito et al., 1987). Un inconvénient majeur de la petite taille de la gerbille est la difficulté de mettre en place une canule dans ses artères pour surveiller la tension artérielle et prélever du sang artériel, de même que dans ses veines, pour injecter un produit susceptible d'être neuroprotecteur.

2.2.2. Modèles d'occlusion de deux et quatre vaisseaux chez le rat

Les modèles globaux chez le rat comprennent l'occlusion de deux vaisseaux avec hypotension par exsanguination et celle de quatre vaisseaux. Comme le polygone de Willis du rat est complet, l'occlusion des carotides ne provoque pas une ischémie du cerveau antérieur puisque les artères vertébrales maintiennent une perfusion cérébrale.

2.2.2.1. Modèle d'occlusion de deux vaisseaux chez le rat

Ce modèle réunit l'occlusion carotidienne bilatérale à une hypotension générale suffisante pour réduire considérablement la circulation sanguine collatérale (Ginsberg et Busto, 1989; Smith et al., 1984). Il fournit de l'information sur la mort cellulaire sélective produite dans l'aire CA1 de l'hippocampe et dans d'autres structures vulnérables, comme le noyau caudé, le putamen et le cortex (Smith et al., 1984). La taille plus importante du rat permet la surveillance de diverses mesures physiologiques (y compris le débit sanguin cérébral, la pression partielle de l'oxygène [PaO₂] et du gaz carbonique [PaCO₂] et la fréquence cardiaque). Un désavantage de cette technique est la nécessité de provoquer l'hypotension par exsanguination. (Ginsberg et Busto, 1989). Le déclenchement de crises convulsives post-ischémiques est un autre problème (Smith et al., 1984).

2.2.2.2. Modèle d'occlusion de quatre vaisseaux chez le rat

Ce modèle permet de produire une ischémie prononcée du cerveau antérieur chez le rat éveillé et libre de se déplacer et de déclencher des troubles neuropathologiques reproductibles. L'opération se déroule, cependant, en deux étapes (Pulsinelli et Brierley, 1979). La première est l'électrocoagulation des artères vertébrales (Pulsinelli et Buchan, 1988), tandis que la seconde, effectuée 24 heures plus tard, consiste à comprimer les carotides avec des pinces qu'on pourra enlever pour permettre la reperfusion. Les inconvénients majeurs de cette technique sont la complexité de la première étape et les variations substantielles entre les sujets d'une souche donnée, qu'ils proviennent d'un seul fournisseur ou de fournisseurs différents (Pulsinelli et Brierley, 1979). Une mortalité postopératoire élevée a été constatée après la première étape (Ginsberg et Busto, 1989).

2.3. Modèles d'ischémie cérébrale aiguë focale

On considère que les modèles d'ischémie focale entraînent des lésions histologiques (infarctissement) similaires à celles d'un AVC ischémique chez l'humain (Macrae, 1992;

McAuley, 1995). En général, l'ischémie focale est produite par l'occlusion (temporaire ou permanente) de certains vaisseaux cérébraux, ce qui endommage des régions précises du cerveau. Le degré de similitude entre ces modèles animaux et l'humain reste à préciser, mais les récents progrès en imagerie et en neuroprotection, qui ont démontré une efficacité pré-clinique, devraient rehausser notre confiance dans la valeur prédictive de ces modèles.

L'efficacité de l'administration post-ischémique d'un neuroprotecteur, dans un modèle animal focal, reste généralement acceptée comme la norme à respecter avant son essai chez l'humain. Les modèles focaux se répartissent en deux types, selon que l'ischémie est permanente ou temporaire. Une ischémie focale permanente entraîne généralement des lésions ischémiques denses dans une zone centrale, entourée d'une zone dite de pénombre, qui est «à risque» et dans laquelle les lésions dégénératives s'étendent habituellement de la zone centrale vers la périphérie. Les lésions qui se produisent dans la zone de pénombre sont dues non seulement à l'hypoperfusion, mais aussi à la propagation de substances chimiques en provenance de la zone centrale. L'administration d'un neuroprotecteur a pour but de protéger la zone de pénombre, puisque la zone centrale (dont l'apport sanguin est presque nul) est probablement endommagée de manière irréversible. Il est peu probable qu'un arrêt permanent et total de l'apport sanguin se produise dans un territoire cérébral humain, en raison de la désintégration du thrombus et de la thrombolyse endogène (Mohr et al., 1986). C'est pourquoi des modèles d'occlusion réversible ont été mis au point. Le recours à des modèles d'ischémie permanente et à des modèles d'ischémie temporaire permet donc d'examiner différents aspects de la cascade ischémique.

2.3.1. Modèles d'occlusion de l'ACM

Les modèles d'occlusion de l'ACM sont très utilisés. Certains auteurs ont suggéré qu'ils étaient particulièrement importants pour la découverte de médicaments, en raison de leur pertinence clinique. En effet, l'ACM est le vaisseau le plus souvent en cause dans un AVC chez l'humain (Karpiak et al., 1989; Mohr et al., 1986). De plus, ces modèles se prêtent particulièrement bien à des techniques de reperfusion, un phénomène courant dans les AVC. Ces modèles sont bien documentés et ont été utilisés avec plusieurs espèces. L'un de leurs principaux inconvénients est le nombre substantiel de variations de la technique d'occlusion, qui a donné lieu à de grandes différences entre les laboratoires, quant à la taille et à la variabilité de la lésion ischémique et à l'efficacité des agents thérapeutiques (Belayev et al., 1996).

L'occlusion physique de l'ACM pour produire une ischémie focale permanente a été réalisée chez plusieurs espèces, y compris la souris (Backhauss et al., 1992; Connolly et al., 1996), le rat (Belayev et al., 1996; Koizumi et al., 1986; Tamura et al., 1981), le chat (Mackay et al., 1993), le chien (Suzuki et al., 1980) et des primates (Marshall et Ridley, 1996). L'occlusion nécessite l'accès à l'ACM, soit par une fenêtre crânienne, auquel cas l'ACM peut être occluse n'importe où sur son parcours, soit par l'introduction dans l'artère carotide d'un filament de nylon de taille appropriée qu'on pousse jusqu'à l'occlusion de l'ACM à son origine dans le polygone de Willis. Chez le rat (Tamura et al., 1981) et la souris (Backhauss et al., 1992), l'approche transcrânienne nécessite l'exérèse d'une partie du crâne et de la dure-mère sous-jacente, puis la section de l'ACM. Cette intervention permet de visualiser l'ACM et d'en vérifier l'occlusion. Son principal inconvénient est qu'il faut ouvrir le crâne, ce qui modifie considérablement la pression intracrânienne. Durant l'ischémie focale avec crâne fermé, la pression intracrânienne est nettement plus élevée à cause du processus ischémique et de la formation d'un œdème. Avec la méthode transcrânienne, l'occlusion permanente de l'ACM est relativement simple, tandis que le déclenchement d'une ischémie temporaire est plus complexe (Macrae, 1992; McAuley, 1995). L'occlusion temporaire de l'ACM avec des clips pour anévrismes nécessite des manœuvres délicates pour ne pas léser les tissus cérébraux situés au-dessous de l'ACM. Cette technique nécessite aussi une anesthésie prolongée.

On peut aussi recourir à la méthode d'occlusion par voie intraluminale (Koizumi et al., 1986; Longa et al., 1989). Cette méthode est particulièrement intéressante parce que les techniques opératoires sont moins délicates qu'avec plusieurs autres méthodes et que le filament de nylon peut, soit être retiré après un certain temps pour permettre la reperfusion (Sydserff et al., 1995b), soit être laissé en place si un modèle d'occlusion permanente de l'ACM est voulu (Sydserff et al., 1995a, 1996). Sous anesthésie, il faut introduire un filament de nylon par une artériotomie au niveau du moignon carotidien externe et le faire remonter le long de l'artère carotide interne jusqu'à ce que le bout du filament soit à l'origine de l'ACM au niveau du polygone de Willis (Figure 3). L'aspect critique de cette opération est qu'il faut que le diamètre terminal du filament soit suffisant pour obstruer le cercle de Willis à l'origine de l'ACM. Pour réduire la variabilité de la taille de l'infarctus d'un animal à l'autre, des chercheurs (Belayev et al., 1996) ont enrobé le filament de poly-L-lysine pour augmenter l'attraction électromagnétique entre la surface du filament et le revêtement endothélial de l'artère occluse.

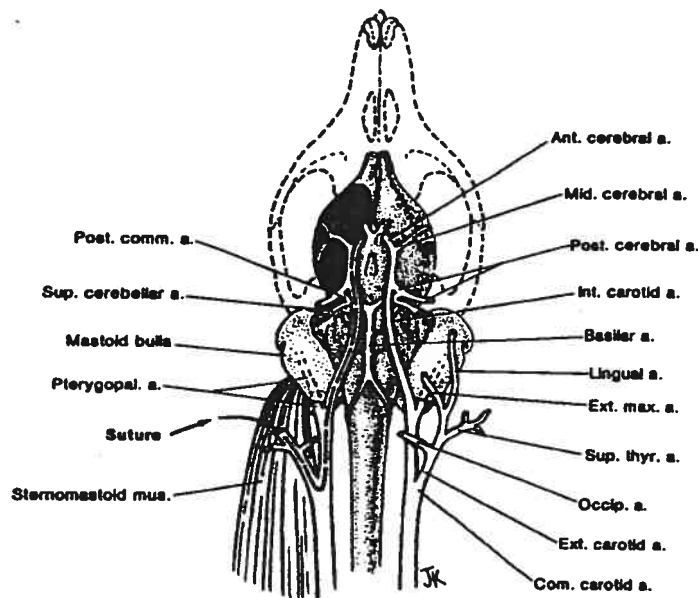


Figure 3. Diagramme anatomique des vaisseaux sanguins cérébraux chez le rat (Longa et al., 1989)

Une hypotension générale a été ajoutée à l'occlusion de l'ACM. Une étude antérieure avait démontré qu'une occlusion ajoutée à une hypotension artérielle produisait un infarctus uniforme et prévisible et pourrait provoquer une lésion comparable à des lésions prolongées (2 h par exemple) chez des sujets normotendus (Corbett et al., 2000; Miyamoto et Auer, 2000; Zhu et Auer, 1995). Ce modèle produit un infarctus de taille moyenne sans causer les effets secondaires importants observés couramment avec l'ischémie prolongée (comme les crises convulsives et le décès). Une autre caractéristique du modèle d'occlusion de l'ACM est l'apparition d'un œdème cérébral (Sydserff et al., 1996), un problème crucial majeur des AVC. Plusieurs études ont étudié l'œdème avec ce modèle et l'œdème semble être une caractéristique régulière de ce modèle d'AVC (Hayward et al., 1993; Park et al., 1994; Sydserff et al., 1996).

2.3.2. Modèle d'ischémie cérébrale par photothrombose

Ce modèle consiste en la formation d'une thrombose par irradiation laser (faisceau étroit d'une longueur d'onde donnée) transcrânienne, après administration intraveineuse d'un colorant photosensible, le rose Bengale, dont l'excitation lumineuse entraîne la libération de radicaux libres (Futrell et al., 1988; Wood et al., 1996). Ces derniers lèsent l'endothélium des vaisseaux sanguins, ce qui crée un foyer pour l'agrégation plaquettaire et

la thrombose. Le thrombus produit est riche en plaquettes et dénué de fibrine (Watson et al., 1985). Cette technique a été utilisée chez le rat. La gravité de l'ischémie et de l'infarctus qui en résultent varie en fonction de la dose de colorant, de l'intensité du faisceau lumineux et de la durée de l'irradiation (Ginsberg et Busto, 1989). Les principaux inconvénients de ce modèle sont : (1) l'impossibilité de déclencher une ischémie temporaire, (2) une altération considérable de la barrière hémato-encéphalique, (3) un apport sanguin collatéral faible et, (4) le fait qu'il n'a pas été démontré que les lésions causées reproduisent un AVC thrombotique chez l'humain.

2.3.3. Modèle d'ischémie cérébrale par thrombo-embolie

Le mécanisme commun final de la majorité des AVC ischémiques chez l'humain est l'occlusion d'une certaine partie de la circulation cérébrale par un thrombus. Puisque la thrombolyse est approuvée au Canada et ailleurs au monde, des efforts ont été faits pour mettre au point des modèles animaux consistant en la production de thrombus et/ou en leur injection dans la circulation artérielle cérébrale (Overgaard et al., 1992). L'occlusion intravasculaire de l'ACM a été réalisée par diverses méthodes destinées à produire une thrombose ou une embolie *in situ*. Par exemple, des caillots autologues ont été introduits dans l'artère carotide interne afin de provoquer des occlusions vasculaires distales (Kudo et al., 1982). Ce modèle a été employé pour étudier les effets neuroprotecteurs de thrombolytiques (Overgaard et al., 1993; Papadopolous et al., 1987; Penar et Greer, 1987). Ce modèle a tendance à produire des infarctus dont la localisation et la taille sont imprévisibles. De plus, un degré notable d'œdème cérébral a tendance à venir compliquer les lésions tissulaires causées par l'ischémie.

2.3.4. Modèle de l'endothéline

Il a été démontré que l'application extraluminale d'endothéline-1, un peptide vasoconstricteur, réduit la circulation sanguine cérébrale de manière comparable aux méthodes plus anciennes d'occlusion de l'ACM (Sharkey et al., 1993). L'application d'endothéline-1 près de l'ACM entraîne une réduction marquée du débit sanguin cérébral et augmente la tension artérielle. Des lésions nettes au niveau du cortex frontal, pariétal et insulaire ont été observées le lendemain de l'application d'endothéline-1. Une certaine atteinte du striatum a également été constatée, quoique la localisation et la taille de la lésion soient variables (Robinson et al., 1990; Sharkey et al., 1993; Sharkey et Butcher, 1995). De

plus, une certaine variation dans la durée de l'action de l'endothéline peut compliquer les études d'une durée déterminée.

2.4. Paramètres à mesurer et embûches des modèles d'ischémie cérébrale aiguë

Un grand nombre de paramètres peuvent être mesurés *in vivo*, selon l'hypothèse étudiée dans l'expérience. La taille et la localisation des lésions produites dans ces modèles varient considérablement pour un laboratoire donné et entre les laboratoires. Le manque de contrôle physiologique précis reflète peut-être le manque de conformité entre les laboratoires. Lors d'études *in vivo* aiguës, plusieurs paramètres valent la peine d'être surveillés pour établir que l'animal anesthésié est dans l'état physiologique optimal et pour évaluer les effets de médicaments potentiels sur ces paramètres.

2.4.1. Température

Qu'il s'agisse d'un modèle *in vitro* ou *in vivo*, les variations de température peuvent être dévastatrices et empêcher les chercheurs de vérifier si l'hypothèse à l'étude est correcte ou non. En effet, un changement de température cérébrale de quelques degrés à peine suffit pour changer substantiellement l'étendue de l'atteinte ischémique. Par exemple, il a été démontré qu'une hypothermie légère ou modérée (33 ou 34 °C), pendant (Welsh et al., 1990) et après (Coimbra et Wieloch, 1994; Colborne et Corbett, 1994) une ischémie cérébrale produisait un effet neuroprotecteur marqué, tandis qu'une hyperthermie entraînait plus de lésions que si la température était normale (Dietrich et al., 1990; Kuroiwa et al., 1990). Lors d'expériences sur l'ischémie cérébrale aiguë, le cerveau peut être soumis à une perte de chaleur à cause (1) de l'anesthésie, qui peut réduire le débit sanguin cérébral et la vitesse du métabolisme, (2) de l'absence ou de la baisse de chaleur fournie au tissu cérébral par le sang circulant et (3) de l'exposition du cerveau au milieu environnant par la perte de tissu naturel isolant (poils, peau, graisse et crâne) en fonction de l'expérience. L'emploi d'un tapis thermique permet de normaliser la température corporelle. Une variation de moins de 0.5 °C de la température corporelle est obtenue évitant ainsi un refroidissement de la température corporelle, un facteur confondant dans l'interprétation des résultats lors de l'évaluation de nouveaux agents neuroprotecteurs (Maher et Hachinski, 1993).

2.4.2. Tension artérielle et gaz du sang artériel

Il a été démontré qu'une hypotension peut altérer la circulation collatérale vers le tissu ischémié et qu'un petit changement tensionnel peut produire de grandes variations histopathologiques et aggraver les résultats obtenus avec les modèles animaux (Ginsberg et Busto, 1989). Il est donc conseillé de surveiller continuellement la tension artérielle (Osborne et al., 1987; Wassmann et al., 1992; Zhu et Auer, 1995). De plus, des altérations pré-ischémiques de la pression partielle du gaz carbonique donnent lieu à des changements substantiels du débit sanguin cérébral, qui sont susceptibles de modifier l'atteinte cérébrale ischémique (Pulsinelli et Jacewicz, 1992). Cependant, le suivi des évaluations des gaz du sang artériel ne se fait, en général, que durant la période de l'induction de l'ischémie cérébrale. Yoshimoto et ses collaborateurs (2002), ont effectué des analyses des gaz sanguins jusqu'à quatre heures suivant la fin de l'induction de l'ischémie cérébrale. Ces chercheurs n'ont remarqué aucune différence entre les groupes (rats contrôles et avec ischémie cérébrale). Gladstone et collaborateurs (2002) ont démontré que le recouvrement après un AVC pouvait être modulé par des agents pharmacologiques. Donc, il apparaît important de continuer à surveiller les paramètres physiologiques, afin de bien s'assurer que l'impact du médicament sur la plasticité neuronale n'est pas due à des changements physiologiques homéostatiques importants, mais bien au médicament lui-même.

2.4.3. Surveillance de la glycémie

Les concentrations plasmatiques et cérébrales de glucose modifient beaucoup les lésions cérébrales ischémiques expérimentales (Nedergaard et Diemer, 1987; Sutherland et al., 1992) ou cliniques (Pulsinelli et al., 1983). On sait que l'hypoglycémie et l'hyperglycémie diminuent et aggravent respectivement l'infarctus chez les animaux de laboratoire (Coimbra et al., 1996; Wassmann et al., 1992), et que les patients qui ont un AVC ischémique connaissent une évolution plus défavorable s'ils sont hyperglycémiques. Une hyperglycémie présente au moment de l'hospitalisation semble faciliter la transformation du tissu hypoperfusé en tissu infarci (Alvarez-Sabin et al., 2003; Williams et al., 2002).

2.4.4. Anesthésie

Plusieurs des effets généraux de l'anesthésie peuvent être réduits ou maîtrisés, si d'autres variables physiologiques sont surveillées de près durant l'expérience. L'anesthésie

peut produire des réductions de la température corporelle et de la tension artérielle et peut occasionner des altérations des gaz du sang artériel, surtout chez les animaux qui ne sont pas soumis à une ventilation mécanique. Certains anesthésiques, comme l'halothane ou les barbituriques, causent une dépression du système nerveux central et réduisent le métabolisme cérébral en fonction de leur dose. D'autres anesthésiques, comme la kétamine et le monoxyde d'azote, exercent des effets excitateurs et ne réduisent pas nécessairement le métabolisme cérébral (Nilsson et Siesjo, 1975). De plus, certains anesthésiques ont présenté des effets variables sur la circulation cérébrale. Par exemple, l'halothane produit un certain degré de vasodilatation, tandis que les barbituriques exercent des effets vasoconstricteurs (Nilsson et Siesjo, 1975). On peut minimiser la plupart de ces effets sur la variabilité de la taille de la lésion en surveillant étroitement les variables physiologiques susmentionnées. Les anesthésiques inhalés ont des propriétés, en général, cérébroprotectrices. Ils causent une augmentation du débit cérébrale sanguin (Todd et Drummond, 1984). L'isoflurane est maintenant utilisé de plus en plus, étant moins hépatotoxiques que l'halotane (Zausinger et al., 2002).

2.5. Modèles animaux utilisés pour l'étude de nouveaux agents neuroprotecteurs

Toute prétention au «meilleur» modèle de rongeur pour mettre à l'essai des neuroprotecteurs présumés, est susceptible de soulever la controverse. La plupart des chercheurs ont leur propre variante des grands modèles publiés (Green et Cross, 1997; Traystman, 2003), et tous allèguent que leur modèle est particulièrement pertinent, même si la valeur prédictive des modèles ne peut pas être démontrée en l'absence d'un médicament cliniquement efficace. Néanmoins, le modèle d'occlusion de l'ACM est maintenant reconnu comme le principal. Les médicaments neuroprotecteurs sont généralement plus efficaces dans les modèles de reperfusion, sans doute parce que les médicaments se rendent au tissu lésé et que certains pourraient agir sur les lésions de reperfusion (Grotta, 2002). Même si l'efficacité d'un médicament dans un modèle de reperfusion pourrait être un critère suffisant si ce médicament était associé à un thrombolytique, l'application clinique des thrombolytiques est limitée. En raison de l'apparition tardive d'une reperfusion spontanée chez les patients atteints d'AVC (Ringelstein et al., 1992), il est peu probable que des composés actifs seulement dans les modèles d'occlusion temporaire ou qui ne peuvent être administrés qu'à des doses efficaces dans les modèles de reperfusion, se révèlent efficaces s'ils sont administrés sans un thrombolytique. Par exemple, le tirilazad,

qui était efficace uniquement dans les modèles d'occlusion temporaire de l'ACM (Xue et al., 1992), a échoué lors d'essais cliniques subséquents (The International Stroke Trial Collaborative Group, 2000). Pour maximiser les chances de succès clinique, il faut qu'un produit soit efficace dans des modèles d'occlusion permanente de l'ACM à des doses qui peuvent être administrées aux humains.

Avant de passer aux études cliniques, tout nouveau traitement potentiel devrait maintenant remplir certaines conditions (voir Tableau II), qui ont été fixées lors de la conférence réunissant des experts de l'académique et de l'industrie (STAIR: Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, 1999).

Tableau II. Conditions à remplir pour qu'un composé passe à l'étape des essais cliniques (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, 1999).

Recommandations de la conférence STAIR
• Études dose-réponse adéquates et concentrations sériques mesurées pour définir les doses efficaces minimale et maximale
• Études d'une durée déterminée pour confirmer l'efficacité
• Les paramètres physiologiques doivent être surveillés
• Études randomisées, à l'insu qui donnent des effets reproductibles (dont une étude indépendante)
• Volume de l'infarctus mesuré et tests fonctionnels utilisés, y compris des évaluations à court et à long termes
• Petit rongeur étudié avec le modèle d'occlusion permanente de l'ACM; si seul un modèle d'occlusion temporaire a été utilisé, il faut alors étudier la reperfusion en clinique
• Emploi de modèle animale avec des cerveaux de plus grande taille (gyrencéphalique) pour les composés tout à fait novateurs
• Études publiées dans des revues spécialisées avec comité de lecture

2.6. Conclusion

Des modèles expérimentaux d'AVC ont été mis au point pour plusieurs espèces, avec de nombreuses variantes méthodologiques (Ginsberg et Busto, 1998; Hossmann, 1998; Koehler, 1998). La plupart de ces modèles ont servi à mettre à l'essai de nombreux neuroprotecteurs potentiels et à étudier les mécanismes sous-jacents de l'ischémie cérébrale. On pourrait réduire les variations entre les expériences en employant des moyens adéquats, comme le recours à des groupes témoins appropriés, le maintien et l'observation de la température, une profondeur d'anesthésie convenable et l'uniformité des techniques chirurgicales. De nos jours, on préfère généralement les modèles d'ischémie focale chez les

petits et les gros animaux, en particulier le modèle d'occlusion de l'ACM (Green et al., 2003b). C'est pourquoi nous nous sommes servis du modèle d'occlusion temporaire de l'ACM dans nos expériences, pour étudier l'effet de l'ischémie cérébrale aiguë sur l'hypoxie et la réponse inflammatoire.

CHAPITRE 3

PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE AIGUË

3.1. Introduction

Le cerveau est un organe complexe qui ne tolère que des ischémies minimales. Malgré des décennies de recherche intense, la réponse cérébrale à l'ischémie n'est pas parfaitement comprise, ce qui se traduit par un nombre limité de traitements offerts aux victimes d'AVC. Les recherches ont démontré que de nombreux événements critiques se produisent au cours des premières minutes d'ischémie. Les phénomènes les plus importants sont un manque d'énergie, la libération massive de neurotransmetteurs excitateurs et l'ouverture concomitante de canaux ioniques qui perturbent l'homéostasie cellulaire. Parmi les événements secondaires se trouvent l'œdème cellulaire (cytotoxique), la production de radicaux libres, l'inhibition de la synthèse de protéines, l'acidose intracellulaire, des dépolarisations spontanées répétées, l'inflammation, la mise en route de mécanismes apoptotiques et un dérèglement de la réparation de l'ADN. De plus, la reperfusion des zones hypoperfusées par la recanalisation des artères peut entraîner la production de radicaux libres susceptibles d'être nocifs pour les cellules. Nous allons passer en revue ici les principaux mécanismes physiopathologiques de l'ischémie cérébrale aiguë, dans le but de donner une vue d'ensemble des événements biochimiques associés à cette pathologie. Nous décrirons ensuite dans les chapitres 4 à 6 les événements plus tardifs qui feront l'objet de notre travail, et qui concernent l'hypoxie, les modifications du système de l'érythropoïétine et l'inflammation post-ischémie cérébrale aiguë.

3.2. La cascade ischémique

En dépit de travaux intenses dans la pathophysiologie de l'AVC, il s'est révélé difficile de mettre au point des traitements neuroprotecteurs qui limitent les lésions neurologiques après un AVC. Une meilleure compréhension de la cascade d'événements cellulaires se produisant après le début d'une ischémie cérébrale pourrait mener à l'exploration d'un certain nombre d'avenues thérapeutiques. Il est donc important de comprendre divers éléments de la cascade ischémique résumés et décrits brièvement ci-après.

3.2.1. Zone centrale d'ischémie et pénombre ischémique

L'occlusion d'une artère cérébrale produit une perturbation hémodynamique qui fait baisser le débit sanguin cérébral à des valeurs qui, si elles persistent, causeront des lésions neuronales irréversibles. Le résultat de cette perturbation peut être quantifié sur une base histologique ou neurologique comme indiquée auparavant. Une ischémie globale est classiquement associée à des événements tels un arrêt cardiaque occasionnant une hypoperfusion de tout l'organe. Ce terme s'applique aussi aux états d'hypoperfusion régionale quand il ne peut y avoir compensation par une circulation collatérale (dans le cas d'une ischémie hémisphérique par exemple). Une ischémie focale découle de l'occlusion d'une artère distale au polygone de Willis, comme l'ACM. Parce que des anastomoses peuvent apporter du sang, le tissu cérébral est soumis à une hypoperfusion moins intense, ce qui occasionne une zone centrale d'ischémie profonde (semblable à une ischémie globale sur le plan physiopathologique) entourée d'une zone de pénombre (voir figure 4 ci-dessous).

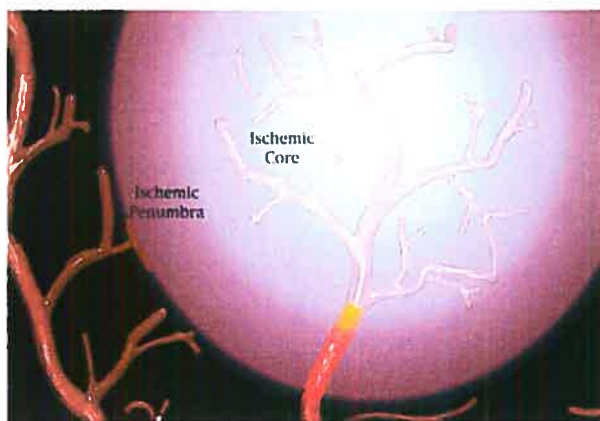


Figure 4. Schéma illustrant la zone centrale d'ischémie et pénombre ischémique (avec la permission d'AstraZeneca)

Dans la pénombre, le sort des neurones est précaire, mais on présume que les lésions sont plus réversibles que dans la zone centrale ischémique. Astrup et ses collègues, ont été les premiers à proposer le concept de pénombre ischémique en 1981 et à suggérer que l'AVC ischémique aigu pouvait être traité. Au moyen d'un modèle d'ischémie focale chez le babouin, ils ont démontré que les tissus présentaient une défaillance électrique à

une valeur plus élevée de débit sanguin cérébral (DSC) [environ 16 mL/100 g/min] que le seuil de défaillance membranaire (environ 10 mL/100 g/min), une défaillance de la Na⁺-K⁺-ATPase membranaire entraînant la libération d'ions K⁺ par les cellules et la dépolarisation membranaire. Ils ont aussi démontré que, pour les valeurs de DSC situées entre ces deux seuils, le tissu pouvait être sauvé puisque le fonctionnement électrique pouvait être rétabli en corrigeant l'ischémie (Astrup et al., 1977). Ils ont appelé «pénombre ischémique» la zone de tissus dans laquelle le DSC se situe entre les seuils de défaillance électrique et de défaillance membranaire. La présence d'une pénombre après un AVC ischémique résulte de la nature de l'ischémie focale.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet d'étudier les fonctions physiologiques ou les processus physiopathologiques. L'IRM de diffusion permet l'identification de la zone d'ischémie cérébrale immédiatement après sa constitution. L'hypersignal de la zone ischémique sur l'IRM correspond à l'immobilité de l'eau piégée dans les cellules lésées suite à l'inhibition ou la sidération des pompes ioniques (Barber et al., 1999). Par contre, l'IRM de perfusion montre l'étendue de la zone de tissu cérébral hypoperfusée. L'utilisation de l'IRM de diffusion et de perfusion donne au clinicien une idée de l'étendue de la zone de tissu hypoperfusée (à risque de nécrose) et de la zone non encore ischémisée (tissu sauvable). La zone d'hypoperfusion moins la zone d'hypodiffusion indique la zone de tissu cérébral non ischémisé à risque de nécrose (Donnan et Davis, 2002). Cette zone s'appelle le mismatch et correspond à la zone dite 'pénombre ischémique' (Parsons et al., 2002; Fisher et Ginsberg, 2004; Reineck et al., 2005). Ces techniques peuvent améliorer le pronostic de l'ischémie cérébrale grâce à une intervention thérapeutique rapide (thrombolyse) (Kidwell et al., 2004).

Le degré d'hypoperfusion dans le territoire ischémique varie à partir du centre, qui reçoit peu de sang d'artères collatérales et qui est très profondément ischémisé, vers la périphérie, qui est moins ischémisée à cause d'un meilleur apport sanguin par des artères collatérales. Comme la durée de la survie tissulaire varie de façon inversement proportionnelle à l'intensité de l'ischémie (Jones et al., 1981), c'est à la périphérie que les neurones survivent le plus longtemps et forment, dans une grande mesure, la pénombre ischémique (Hakim, 1999). La durée de la survie des neurones de la pénombre, soit la période pendant laquelle un traitement de l'AVC peut être utile, n'a pas été déterminée chez l'humain. En utilisant la tomographie par émission de positrons pour mesurer le DSC, la consommation cérébrale d'oxygène et le taux d'extraction d'oxygène et en définissant la

pénombre comme étant le tissu au DSC réduit, à la consommation d'oxygène relativement constante et au taux d'extraction d'oxygène élevé, une zone de pénombre a été détectée à la périphérie de l'ischémie pendant une période allant jusqu'à 72 heures après un AVC (Heiss et al., 1992; Wise et al., 1983). Cette zone peut comprendre une proportion considérable du volume final de l'infarctus (jusqu'à 50 %) même jusqu'à 17 heures après l'AVC (Marchal et al., 1996), mais la majeure partie de la pénombre subit généralement des troubles métaboliques progressifs et l'infarctissement au cours des 2 à 3 semaines suivant l'AVC (Heiss et al., 1992). L'évolution de l'AVC dépend de la proportion de la zone de pénombre qui survit à l'ischémie (Furlan et al., 1996). C'est pourquoi un traitement qui conserve ou qui sauve des neurones de la pénombre devrait améliorer l'évolution clinique des patients atteints d'AVC.

Mort cellulaire par apoptose dans la zone pénombrique

Il y a de plus en plus d'évidence au niveau moléculaire et biochimique qu'il y a des événements apoptotiques dans les modèles d'ischémie focale (Kametsu et al., 2003). L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui se produit au cours du développement embryonnaire et chez l'organisme adulte dans différents tissus de l'organisme permettant ainsi de limiter la tailles des populations cellulaires et d'éliminer certaines cellules indésirables. Contrairement à la nécrose, l'apoptose ne s'accompagne pas d'une réaction inflammatoire. Une des premières modifications morphologiques dues à l'apoptose est la réduction du volume cellulaire. Le cytoplasme devient très condensé avec des organites cellulaires morphologiquement intacts (Yao et al., 2001). Le noyau subit aussi une réduction de volume, la chromatine se condensant puis se fragmentant en petits lobes entourés par la membrane nucléaire. Par la suite, la cellule se fragmente et des protubérances membranaires se forment et vont se séparer de la cellule pour former les 'corps apoptotiques', entourés par la membrane plasmique (Mergenthaler et al., 2004). Les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés par les cellules adjacentes ou par les macrophages permettant ainsi d'éviter le relargage du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire empêchant ainsi une réaction inflammatoire (Yao et al., 2001).

Trois mécanismes d'apoptose sont proposés au niveau du cerveau. Tous ces mécanismes impliquent l'activation de la caspase-3. Le premier mécanisme d'apoptose proposé dépend de la mitochondrie (Martinou et Green, 2001; Zamzami et Kroemer G, 2001) incluant l'activation des protéines de la famille des Bcl-2 (Tsujimoto, 2002). Le

deuxième mécanisme est médié par les récepteurs de la mort (récepteurs Fas et TNF- α) (Ashkenazi et Dixit, 1998; Walczak et Krammer, 2000) et le troisième mécanisme d'apoptose serait initié par le stress au niveau du réticulum endoplasmique (RE) qui causerait une accumulation de protéines anormales dans le RE (Diaz-Horta et al., 2002; Nishitoh H et al., 2002). Finalement, la mort cellulaire par apoptose observée dans la zone pénombrique serait considérée comme un mécanisme d'autoprotection des cellules du cerveau (Ueda et Fujita, 2004).

3.2.2. Défaillance énergétique

Pour fonctionner normalement, le cerveau doit recevoir continuellement de l'énergie pour générer, maintenir et restaurer les potentiels électriques membranaires utilisés pour la communication et pour la synthèse, le stockage et le captage des neurotransmetteurs, en plus de l'énergie nécessaire à l'homéostasie cellulaire. Pour répondre à ces besoins, le cerveau humain utilise environ 20 % de l'oxygène métabolisé par le corps au repos et consomme à peu près 30 micromoles de glucose par gramme de tissu par heure. Les réserves cérébrales de glucose et de glycogène étant faibles, le cerveau doit recevoir continuellement des substrats énergétiques (oxygène et glucose) du sang pour maintenir une structure et un fonctionnement adéquats. Une réduction de cet apport sanguin cause des lésions cérébrales dont le degré dépend de l'intensité et de la durée de l'hypoperfusion.

La mort éventuelle d'une bonne partie de la pénombre est due à une cascade d'événements complexes qui suit le début de l'ischémie (voir figure 5). La défaillance énergétique est l'incapacité de former des nucléotides-triphosphates, notamment l'adénosine-triphosphate (ATP), par glycolyse aérobie (cycle de Krebs); cette défaillance énergétique est causée par l'hypoxie et la diminution du débit sanguin cérébral. Voici les trois principales conséquences de cette défaillance (Feuerstein et Wang, 2000): (1) un métabolisme anaérobie devient la principale voie de production énergétique et entraîne une acidose intracellulaire et extracellulaire, causée dans une grande mesure par l'accumulation de lactate; (2) la perturbation de l'homéostasie ionique permet l'entrée de sodium, de chlore et de calcium; (3) la destruction de l'intégrité de la membrane cellulaire entraîne l'impossibilité de synthétiser des macromolécules pour maintenir la structure de la membrane et prévenir la destruction de ses constituants par lipolyse et protéolyse (Seisjo, 1992a). La dégradation enzymatique dépend, dans une grande mesure, de l'activation par le

calcium (Siesjo, 1992b). La principale source d'énergie dans le cerveau est le métabolisme aérobie du glucose (Siesjo, 1992a), mais le cerveau met aussi de l'énergie en réserve sous forme de phosphocréatine (PC) qui peut fournir de l'énergie temporairement en présence d'une hypoxie ou d'une ischémie quand le métabolisme aérobie ne peut pas être maintenu (Siesjo, 1992a).

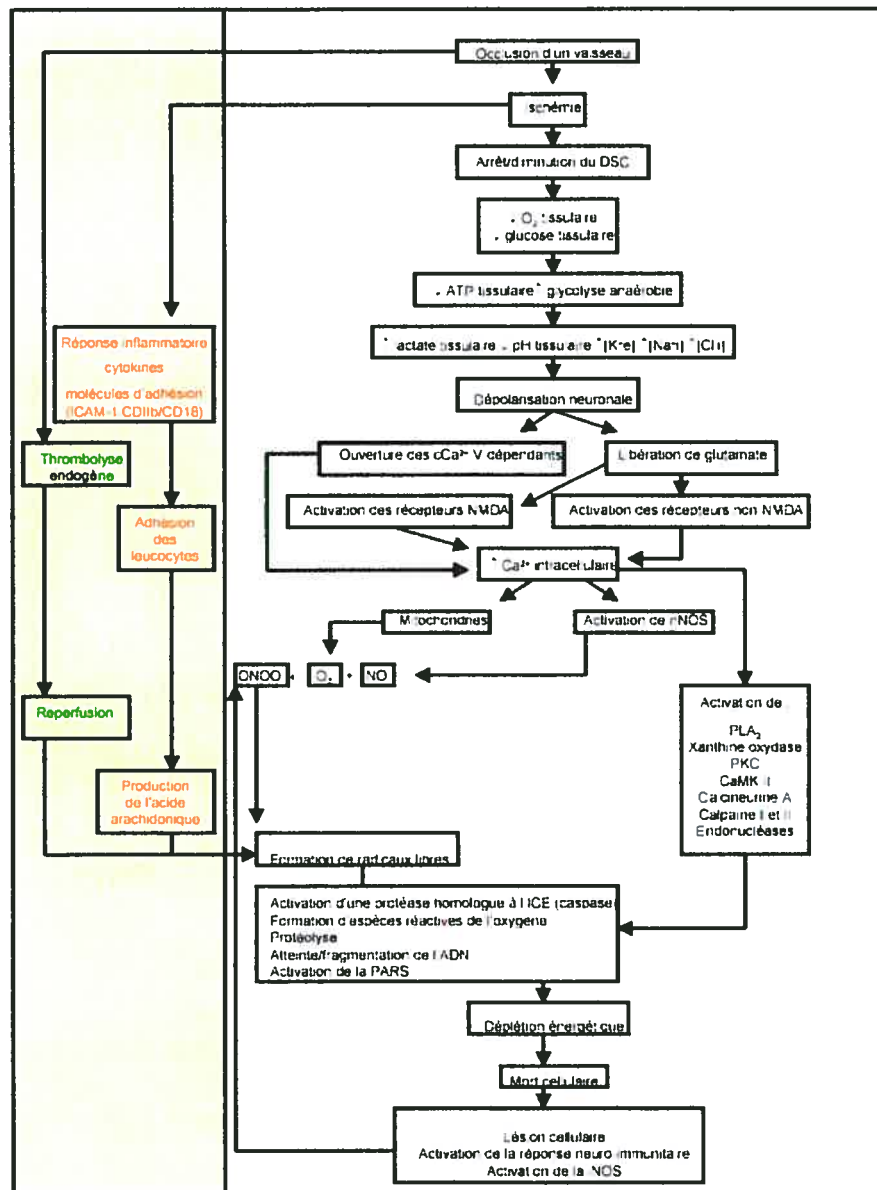


Figure 5. Mécanismes présumés de la mort neuronale après l'apparition d'une ischémie cérébrale aiguë (Tiré et modifié de : Read et al., 1999; Samdani et al., 1997)

Le métabolisme anaérobique est possible dans le cerveau, mais il ne fournit pas assez d'énergie sous forme d'adénosine-triphosphate (ATP) pour que le cerveau fonctionne normalement et il produit du lactate (Salford et al., 1973) qui cause une acidose régionale toxique pour les neurones (Ginsberg et al., 1980). La présence d'une hyperglycémie au début d'une ischémie cérébrale dans les modèles animaux donne lieu à un plus grand degré d'atteinte ischémique que la présence d'une hypoglycémie, à cause d'une plus grande accumulation de lactate (Welsh et al., 1980). Une fois que les réserves de phosphate riches en énergie (ATP et PC) sont épuisées dans le cerveau, les neurones ne peuvent plus maintenir le potentiel membranaire nécessaire pour garder le potassium à l'intérieur et prévenir l'entrée de sodium. Il en résulte une entrée de sodium et d'eau dans les neurones, qui enflent, provoquant un œdème cytotoxique dans la région ischémisée du cerveau (Fishman, 1975). Au moment de la nécrose neuronale, des protéases et des lipases sont expulsées dans le parenchyme cérébral environnant, causant la destruction du neuropile et un œdème vasogénique interstitiel (Fishman, 1975). La déplétion des réserves énergétiques provoque également la libération de neurotransmetteurs (les molécules qui interviennent dans la transmission d'information d'un neurone à l'autre à travers la synapse). Des concentrations élevées de neurotransmetteurs extracellulaires peuvent être toxiques pour les neurones. Le glutamate (un acide aminé) exerce un effet excitateur sur les neurones et cause une atteinte excitotoxique entraînant la mort neuronale dans l'ischémie (Hakim, 1999; Rothman, 1984).

L'ischémie dérange la production cellulaire d'énergie, et la déplétion de l'adénosine-triphosphate (ATP) perturbe à son tour le fonctionnement de la membrane cellulaire et l'homéostasie ionique en interférant avec la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. Au début, quand l'ischémie est légère, cela se manifeste par le gonflement de la cellule (œdème cytotoxique), ce qui permet de déceler un AVC aigu par IRM de diffusion (Kohno et al., 1995). Lorsque l'ischémie s'aggrave, quand le DSC atteint environ 10 mL/100 g/min, la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ cesse de fonctionner, ce qui entraîne la sortie d'ions K^+ hors de la cellule et l'entrée d'ions Ca^{++} dans la cellule (Harris et al., 1981; Harris et Symon, 1984). Cette dépolarisation ischémique s'accompagne d'une libération incontrôlée de neurotransmetteurs, en particulier de l'acide aminé excitateur: le glutamate (Harris et Symon, 1984; Matsumoto et al., 1993; Shimada et al., 1989).

3.2.3. Déséquilibre ionique et homéostasie du calcium

De cinq à dix secondes après le début d'une ischémie complète, les réserves d'ATP sont épuisées et les neurones ont perdu leur potentiel de membrane au repos. C'est alors que commencent des mouvements transmembranaires incontrôlés d'ions. La dépolarisation initiale cause une grande augmentation de la concentration extracellulaire de potassium, qui est amoindrie rapidement dans le tissu viable par la capture de potassium par les astrocytes (Fisher et Schaebitz, 2000).

Ces derniers peuvent gonfler et ils passent à la glycolyse anaérobie pour produire de l'ATP afin de défendre l'homéostasie ionique membranaire. Ce faisant, ils captent du glutamate et produisent du lactate. L'œdème cytotoxique et l'enflure du cerveau qui surviennent après un AVC sont probablement dus au gonflement des astrocytes et à l'osmolyse qui en résulte (Siesjo, 1988; Siesjo, 1992b; Siesjo et Bengtsson, 1989). Comme la pompe à sodium-potassium ne fonctionne plus, il y a une entrée d'ions sodium, suivis de chlore et d'eau. Il en résulte la mort cellulaire par l'accroissement rapide de l'œdème cytotoxique, qui génère l'osmolyse (Ginsberg, 1996). Ceci est considéré comme le mécanisme présumé de la mort cellulaire immédiate. La mort cellulaire retardée résulte de l'interaction entre plusieurs processus mis en branle par ces grandes perturbations précoces des canaux ioniques.

Le changement de la concentration intracellulaire de calcium est un signal sensible, pouvant amorcer plusieurs cascades biochimiques (Carafoli, 1987; Siesjo, 1990). Pour maintenir le gradient de calcium voulu, la cellule piège le calcium dans des sites de stockage intracellulaires et dépense de l'énergie par deux mécanismes pour expulser la majeure partie du calcium hors de la cellule. Le premier mécanisme fait intervenir une ATPase dépendante du calcium et le second met en jeu un échangeur sodium-calcium (Carafoli, 1987; Grotta et al., 1990; Miller, 1987; Siesjo et Bengtsson, 1989). Une partie du calcium piégé dans les organelles, le réticulum endoplasmique et les mitochondries, peut augmenter de la libération de calcium des protéines intracellulaires à la suite d'une acidose, car les protons entrent en concurrence avec le calcium pour se lier aux protéines intracellulaires (troponine C, calmoduline, calcibindine, entre autres) (Carafoli, 1987; Grotta et al., 1990; Siesjo, 1988; Siesjo, 1990; Siesjo, 1992b; Siesjo et Bengtsson, 1989). L'augmentation de de calcium intracellulaire est peut-être cruciale pour amorcer les premières étapes des lésions cellulaires dues à l'ischémie et déclenche peut-être aussi une nouvelle entrée de calcium extracellulaire (Carafoli, 1987; Siesjo, 1988; Siesjo, 1990;

Siesjo et Bengtsson, 1989). Il existe deux types de canaux par lesquels le calcium entre dans les neurones : les canaux calciques voltage-dépendants et les canaux calciques dépendants des récepteurs (Carofoli, 1987; Ginsberg, 1996; Greenberg, 1987; Grotta et al., 1990; Miller, 1987; Siesjo, 1992b).

3.2.4. Excitotoxicité

Les canaux calciques dépendant des récepteurs sont activés principalement par les acides aminés excitateurs et font intervenir deux types de récepteurs glutamatergiques principaux (Carter et al., 1983; Choi, 1990; Mody et MacDonald, 1995; Siesjo, 1992a; Siesjo et Bengtsson, 1989; Urban et al., 1990; Fisher et Schaebitz, 2000). Ces récepteurs contribuent le plus à l'entrée postsynaptique de calcium. Cette entrée est considérée comme le facteur principal qui entraîne un grand nombre des cascades biochimiques néfastes menant à la mort cellulaire retardée (Mergenthaler et al., 2004). Les deux types de récepteurs glutamatergiques sont les récepteurs activés par le kainate/quisqualate (K/Q) et ceux activés par le N-méthyl-D-aspartate (NMDA), qui se distinguent par leur sensibilité aux composés leur donnant leur nom. Le récepteur K/Q est perméable à l'entrée de cations monovalents et permet également la sortie de potassium mais pas celle de calcium (Miller, 1987). Le récepteur NMDA est perméable aux cations monovalents et au calcium. Ce canal est bloqué par le magnésium aux concentrations normales, mais ce blocage physiologique est supprimé par la dépolarisation. L'activation des canaux calciques dépendant des récepteurs nécessite l'entrée de calcium pour permettre l'activation du récepteur NMDA par le glutamate et la dépolarisation (Carter et al., 1983; Choi, 1990; Mody et MacDonald, 1995; Siesjo, 1992; Urban et al., 1990).

3.2.4.1. Rôle majeur du glutamate et du calcium dans la cascade ischémique

Une libération massive de glutamate au niveau des terminaisons présynaptiques active non seulement le récepteur NMDA mais aussi le récepteur à l' α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate (AMPA) [qui permet l'entrée de Na^+ et la sortie de K^+], ce qui provoque la dépolarisation des neurones adjacents et déclenche une nouvelle libération de neurotransmetteurs (Lo et al., 2003). Cela augmente les besoins énergétiques des neurones qui se retrouvent en manque d'énergie. C'est la base des lésions cellulaires dites excitotoxiques (Choi, 1992; Lo et al., 2005). La dépolarisation, qu'elle soit déclenchée par le manque d'énergie ou le glutamate, s'accompagne d'une entrée de Ca^{++} . Le Ca^{++} entre

dans la cellule par les canaux calciques récepteur-dépendants notamment les récepteurs NMDA, ou les canaux calciques voltage-dépendants activés quand l'entrée de Na^+ provoque la dépolarisation. Les canaux calciques voltage-dépendants de types L et T se trouvent sur les membranes postsynaptiques, tandis que ceux des types N, P et Q se trouvent sur les membranes présynaptiques. Les types L et T participent aussi à la cascade ischémique par une augmentation du Ca^{++} en réponse à la dépolarisation (Miller, 1987; Read et al., 1999). Le mouvement des ions Ca^{++} de l'espace extracellulaire à l'espace intracellulaire et leur libération hors des sites de stockage internes déclenchent l'activation d'enzymes [protéases, phospholipases, endonucléases, protéine-kinases, NO-synthase (NOS), etc.] susceptibles de modifier la structure et le fonctionnement de divers constituants cellulaires (canaux ioniques membranaires, récepteurs, éléments du cytosquelette, etc.) (Siesjo, 1992a).

Le glutamate stimule aussi les récepteurs métabotropes (voir figure 6), ce qui mène à l'activation de phospholipases, notamment la phospholipase C (PLC) et la phospholipase A₂ (PLA₂) (Katsura et al., 1993; Pin et Duvoisin, 1995). La PLC scinde le phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG) (Pin et Duvoisin, 1995; Siesjo, 1992a). L'IP₃ déclenche la libération du Ca^{++} des sites de stockage internes (appelés «calciosomes», y compris le réticulum endoplasmique) (Pin et Duvoisin, 1995). L'hydrolyse des phospholipides membranaires endommage la membrane cellulaire et entraîne la libération d'acides gras libres et de lysophospholipides toxiques de par leur nature. L'activation de la PLC et de la PLA₂ fournit un substrat pour la synthèse d'acide arachidonique (AA) (Siesjo, 1992a). L'acide arachidonique potentialise les courants aux récepteurs NMDA (Miller et al., 1992), empêche l'acide γ -aminobutyrique (GABA) d'inhiber les neurones par une action directe ou indirecte de ses métabolites (prostaglandines et leucotriènes) sur le canal chlore du récepteur GABA_A (Schwartz et Yu, 1992) et donne lieu aux eicosanoïdes, soit les prostaglandines (PG) et les thromboxanes (TX) par la voie de la cyclo-oxygénase et les leucotriènes (LT) par la voie de la lipoxygénase. L'activation de la PLA₂ produit également une augmentation des taux du facteur d'activation des plaquettes (PAF), qui peut altérer le fonctionnement membranaire et agir comme agent chimiotactique (Siesjo, 1992b).

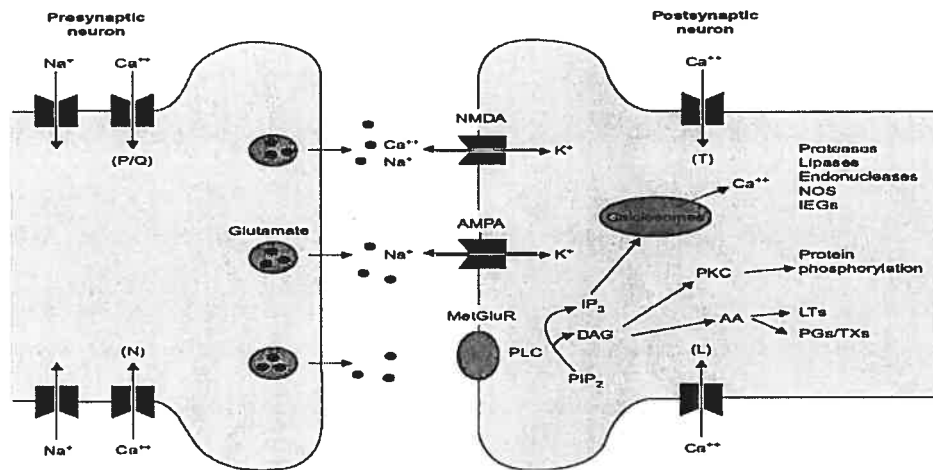


Figure 6. Diagramme schématisque illustrant les canaux ioniques et récepteurs pré- et post-synaptiques (Read et al., 1999)

L'accumulation de DAG active aussi la protéine kinase C (PKC), ce qui donne lieu à la phosphorylation de protéines et modifie les canaux ioniques et l'activité des récepteurs, quoique cette activation soit transitoire (Chen et Huang, 1992). Des événements reliés à l'ADN, comme l'expression de gènes précoces et la synthèse de protéines, sont aussi déclenchés (Siesjo, 1992b). Des enzymes protéolytiques, y compris les cystéine protéases neutres calcium-dépendantes appelées calpaïnes, sont activées par la hausse des taux de Ca^{++} intracellulaire ($[\text{Ca}^{++}]_i$). Ces enzymes sont responsables de la dégradation de la spectrine et des protéines des microtubules et des neurofilaments. Une activité accrue de ces enzymes perturbe le transport (axonal) intracellulaire et les fonctions membranaires contribuant à la stabilité des processus dendritiques et axonaux (Siman et Noszek, 1988). Les changements morphologiques précoces et la perturbation de la transmission synaptique reflètent peut-être la dégradation de structures du cytosquelette par la calpaïne. Le courant de Ca^{++} à travers la membrane mitochondriale contrôle également un certain nombre d'enzymes mitochondriales, mais son importance est habituellement limitée. Par contre, si la concentration de $[\text{Ca}^{++}]_i$ augmente énormément, du Ca^{++} peut s'accumuler à l'intérieur des mitochondries et perturber leur fonction métabolique (Gunter et Pfeiffer, 1990; Zoratti et Szabo, 1995). Une grande partie des lésions ischémiques sont médiées par des radicaux libres toxiques. Ces radicaux libres peuvent provenir d'un certain nombre de sources, y compris le métabolisme de l'acide arachidonique, l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine par la xanthine oxydase, la formation de monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), par la NOS et par la respiration mitochondriale (Lo et al., 2003). L'augmentation massive de la

quantité intracellulaire de calcium active plusieurs seconds messagers, ce qui perturbe davantage la cellule atteinte. L'ADN est détruit par l'activation d'endonucléases. La production mitochondriale d'ATP est perturbée. Des lipases sont activées par la destruction de la membrane cellulaire (Ginsberg, 1996; Mody et MacDonald, 1995; Siesjo, 1992a; Siesjo et Bengtsson, 1989). Choi (1990) a résumé plusieurs mécanismes qui limitent la zone ischémique; la plupart d'entre eux reposent sur l'inhibition de la libération de glutamate ou des récepteurs NMDA (Choi, 1990).

Enfin, comme on l'a vu précédemment, le calcium intracellulaire semble être la voie commune finale de la mort neuronale ischémique, par la génération de lipases qui libèrent des acides gras libres pouvant stimuler la peroxydation de lipides et par la libération de protéases qui détruisent les protéines des neurones (Siesjo, 1992a; Fisher et Schaebitz, 2000).

3.2.4.2. Rôle des neurotransmetteurs dans la cascade ischémique

Il a été démontré qu'une libération massive de dopamine se produit quand le striatum devient ischémique (Slivka et al., 1988). La déplétion de dopamine avant le début d'une ischémie protège le striatum contre des lésions neuronales (Globus et al., 1987; Weinberger et al., 1985) et protège aussi la substance blanche avoisinante (Weinberger et Nieves-Rosa, 1988). La mort neuronale ischémique est retardée même si la cascade ischémique est immédiatement mise en branle (Siesjo, 1992a; Siesjo, 1992b), et les neurones ne montrent pas de signes pathologiques de nécrose pendant huit heures après le début d'un AVC (Brown et Brierley, 1973). Les neurones peuvent être sauvés de la nécrose par l'administration précoce, dans les trois heures, d'antagonistes des récepteurs NMDA comme le MK-801 ou le dextrométhorphan (Park et al., 1988). Toutefois, dans l'ischémie grave, même si la nécrose est prévenue, l'apoptose, une mort cellulaire programmée qui dépend de la synthèse d'ADN, peut toujours se produire causant la contraction et la destruction des neurones (Linnik et al., 1995). Plusieurs régions du cerveau sont particulièrement vulnérables à des baisses uniformes du débit sanguin cérébral, comme l'aire CA1 de l'hippocampe, les petits neurones du striatum et la couche cellulaire IV du néocortex cérébral. Ces neurones subissent une nécrose ischémique même quand les neurones qui les entourent survivent (Brown et Brierley, 1973). Les terminaisons nerveuses, qui sécrètent des neurotransmetteurs, sont aussi très vulnérables à l'ischémie. Les neurones dopaminergiques et noradrénergiques sont plus sensibles que les neurones

sérotoninergiques, glutamatergiques et GABAergiques (Weinberger et al., 1983; Weinberger et Cohen, 1982). Le GABA est reconnu pour être le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux humain (Brailowsky et al., 1986; Kandel et Schwartz, 1991). Son rôle dans l'AVC a été examiné. Le GABA exerce son effet de neurotransmetteur en principalement augmentant la conductance au chlore (Kandel et Schwartz, 1991; Roberts, 1974). Il a été démontré que l'administration exogène de GABA induit l'ouverture des canaux chloriques (Liu et al., 1995). Cela entraîne l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire, ce qui diminue l'excitabilité cellulaire prévenant ainsi l'accumulation de calcium intracellulaire. Des études cliniques récentes ont cependant démontré le manque d'efficacité d'un agoniste du récepteur GABA-A, le clométhiazole, dans le traitement aigu de AVC.

3.3. Inflammation

3.3.1. Dérivés de l'acide arachidonique

Les dérivés de l'acide arachidonique, soit les prostaglandines et les leucotriènes, jouent un rôle important dans les maladies vasculaires cérébrales. Quand l'ischémie commence, la concentration intracellulaire de calcium augmente, ce qui active les phospholipases. Ces dernières dégradent les phospholipides, d'où la libération d'acides gras, y compris l'acide arachidonique, qui est transformé rapidement en divers métabolites par plusieurs voies (Hsu et al., 1989; Kiwak et al., 1985; Rosenberg et al., 1996; Siesjo, 1992b). L'acide arachidonique même peut endommager les cellules. En fait, le gonflement glial constaté dans un modèle de culture cellulaire a été attribué uniquement à l'acide arachidonique (Staub et al., 1994). Ils pourraient contribuer à l'hypoperfusion post-ischémique (Hsu et al., 1989) et ainsi augmenter l'œdème cérébral et produire des lésions neuronales irréversibles (Hsu et al., 1989; Kiwak et al., 1985; Siesjo, 1992a).

3.3.2. Cellules et cytokines pro-inflammatoires

L'une des caractéristiques clé de la réaction inflammatoire aiguë est l'invasion de neutrophiles qui libèrent des protéases et participent à la formation de radicaux libres, comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). La migration des neutrophiles est régulée par des interactions entre les leucocytes circulants et l'endothélium vasculaire. Les principales molécules responsables de cette interaction sont les intégrines situées à la surface des

leucocytes (notamment CD11/CD18) et les molécules d'adhérence exprimées après l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α (Wang et Shuaib, 2002). Plusieurs études ont démontré que le déficit neurologique post-ischémique est réduit quand les animaux sont prétraités avec des anticorps qui inhibent l'action de ces molécules (Clark et al., 1991a; Clark et al., 1991b; Chen et al., 1994; Zhang et al., 1994). Dans d'autres modèles d'occlusion permanente, l'effet bénéfique sur le déficit neurologique post-ischémique a été minime, ce qui montre une différence entre l'ischémie-reperfusion transitoire et l'ischémie permanente (Takeshima et al., 1992).

La concentration des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6 est augmentée après l'ischémie; les cytokines pourraient jouer un rôle important dans la régulation du processus inflammatoire post-ischémique (Emsley et Tyrrell, 2002). Dans le système nerveux central, le TNF- α est produit principalement par la microglie, même si une régulation positive neuronale a aussi été mise en évidence peu après une ischémie. Le TNF- α contribue à la propagation de la réponse inflammatoire en augmentant l'expression des molécules d'adhérence par les cellules endothéliales. Le TNF- α est aussi associé à l'activation de la microglie et à la rupture de la barrière hémato-encéphalique. La concentration du facteur d'activation des plaquettes (PAF) est également accrue peu après une intervention chirurgicale; il pourrait être un médiateur important de la réaction inflammatoire précoce à l'ischémie et pourrait produire un effet cytotoxique direct sur les neurones (Frerichs et al., 1990; Lindsberg et al., 1990). Une meilleure compréhension du rôle des cytokines pro-inflammatoires dans la modulation de la réponse du cerveau à l'ischémie pourrait nous indiquer de nouvelles stratégies pharmacologiques pour réduire les lésions cérébrales après un AVC. Il est aussi possible que la mesure des cytokines pro-inflammatoires nous donne des renseignements diagnostiques et pronostiques et nous aide à identifier les patients en phase aiguë d'AVC. De récentes observations permettent de penser que la production précoce d'IL-6, détectée dans le liquide céphalo-rachidien et le plasma, pourrait être corrélée à la taille finale de l'infarctus après un AVC aigu chez l'humain (Fassbender et al., 1994; Tarkowski et al., 1995a). Par ailleurs, des anticorps dirigés contre des antigènes leucocytaires ont réduit des lésions cellulaires ischémiques (Chen et al., 1994), et des molécules d'adhérence sont devenues des cibles pour des traitements novateurs de l'AVC (Wang et al., 1995; Wang et Shuaib, 2002).

3.4. Reperfusion et production de radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques formées dans toutes les cellules (Chan et al., 1984; del Maestro, 1980; Flamm et al., 1978; Hall et Braughler, 1989; Ikeda et Long, 1990; Piantadosi et Zhang, 1996; Schmidley, 1990; Siesjo, 1992a; Werns et Lucchesi, 1990) et qui sont caractérisées par la présence d'un seul électron non-couplé sur leur couche externe. Étant très réactifs, ils causent des lésions cellulaires en réagissant avec des lipides, des protéines et des acides nucléiques (Ginsberg, 1996; Lo et al., 2003).

Les cellules ont deux types de mécanismes de défense pour se protéger : des mécanismes enzymatiques et d'autres non enzymatiques. Les voies enzymatiques comprennent la neutralisation par la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase. Les méthodes de neutralisation non enzymatiques comprennent le recours au glutathion, à l' α -tocophérol et à l'acide ascorbique (Chan, 1996; del Maestro, 1980; Siesjo, 1992b). Le radical libre superoxyde (O_2^{\cdot}) est ubiquitaire et est produit durant n'importe lequel des processus suivants : l'activité respiratoire mitochondriale normale (Schmidley, 1990), la synthèse de prostaglandines (Astrup et al., 1981) et la flambée respiratoire des neutrophiles (Chan, 1996; del Maestro, 1980; McCord, 1985; Roberts, 1974; Siesjo, 1992b). Les moyens de défense contre les radicaux oxygénés sont moins efficaces durant une ischémie, surtout durant la reperfusion (Ginsberg, 1996). La majeure partie des lésions causées par les radicaux libres se produisent durant une ischémie prolongée, en particulier quand elle est suivie d'une reperfusion (Siesjo, 1992). Flamm et ses collègues (1978), ont étudié un modèle d'occlusion de l'ACM chez le chat et ont trouvé des signes d'une production accrue de radicaux libres. Kumar et ses collègues (1996), ont démontré que les cellules endothéliales produisent des radicaux hydroxyle (OH^{\cdot}), ce qui porte à croire que la microcirculation cérébrale pourrait être une source importante de ces espèces. Chan et ses collègues (2001), ont examiné les effets des radicaux oxygénés, en portant une attention particulière aux changements de perméabilité des vaisseaux cérébraux chez des rats dont le parenchyme avait reçu une perfusion d'une solution productrice de radicaux libres. D'après leurs résultats, ces radicaux libres influençaient la taille des lésions des neurones, le degré de la névroglie et l'homéostasie physiologique des cellules endothéliales des vaisseaux cérébraux.

3.5. Conclusion

Cette cascade ischémique d'événements complexes montre qu' il existe plusieurs points ou on pourrait utiliser des agents pharmacologiques pour réduire les effets nocifs de l'ischémie. À l'heure actuelle, on suppose que la zone centrale d'ischémie (infarctus) ne peut pas être sauvée, mais que la zone de pénombre qui l'entoure, même si elle est perturbée par la baisse de débit sanguin cérébral, peut être sauvée dans des conditions appropriées (par la recanalisation ou l'administration d'un neuroprotecteur. Il y a lieu de croire que, sans traitement, la zone de pénombre finit par faire partie de la zone centrale (Ginsberg, 2003)

CHAPITRE 4

HYPOXIE APRÈS ISCHÉMIE CÉRÉBRALE AIGUË

4.1. Introduction

L'organisme réagit à l'hypoxie en déclenchant des réactions adaptatives visant à préserver le transport de l'oxygène dans l'organisme et son acheminement vers les cellules et à assurer la résistance des cellules aux conséquences d'une hypoxie profonde. L'hypoxie est différente de l'ischémie sur le plan physiopathologique. Ainsi, le débit sanguin cérébral est accru en état d'hypoxie, tandis qu'il est réduit dans l'ischémie. De plus, l'hypoxie altère uniquement le transport de l'oxygène; les substances nutritives telles que le glucose continuent d'être acheminées par le sang et les produits du métabolisme tels, que le lactate et les ions H, continuent d'être éliminés grâce au débit sanguin accru. Dans la plupart des cas, l'hypoxie seule ne cause pas de déficits neurologiques, même lorsqu'elle est grave ($\text{PaO}_2 < 30 \text{ mm Hg}$) (Higgins et al., 1991; Ooiwa et al., 1993) ou extrême ($\text{PaO}_2 < 20 \text{ mm Hg}$) (DeVeber et al., 1998; Isler, 1984). Contrairement à l'ischémie, l'hypoxie n'entraîne pas la libération d'acides aminés excitateurs (Ridker et al., 1997). De plus, l'hypoxie est une composante physiopathologique de nombreuses affections, y compris la crise cardiaque, l'AVC et le cancer, principales causes de mortalité dans les sociétés occidentales (Iyer et al., 1998). Comme indiqué plus haut, l'hypoxie locale est une conséquence directe de l'ischémie cérébrale aiguë, en raison d'une réduction plus ou moins importante de l'acheminement de l'oxygène vers les régions touchées par l'ischémie. Toutefois, on dispose de peu d'informations sur l'impact de l'ischémie cérébrale sur l'état homéostatique de l'oxygène en périphérie. Un niveau d'oxygène insuffisant en périphérie peut avoir des effets délétères sur les sujets atteints d'AVC tels que, par exemple, l'aggravation des signes neurologiques et la mortalité, et peut aussi perturber le processus de réadaptation après la phase aigüe de l'AVC (Halim et Roffe., 2001). Dans les sections qui suivent, nous décrirons brièvement les mécanismes de détection de l'oxygène et les observations cliniques des cas d'hypoxie systémique ou hypoxémie chez les victimes d'AVC. Nous résumerons ensuite les connaissances actuelles sur les causes possibles de l'hypoxie systémique post-AVC, ses effets sur différents paramètres physiologiques et les traitements proposés.

4.2. Mécanismes de détection de l'oxygène et hypoxie post-ischémique

Une privation en oxygène déclenche un vaste éventail de réactions visant à rétablir l'homéostasie de l'oxygène dans les tissus atteints. Ces réactions d'adaptation ont pour but d'augmenter l'apport en oxygène et de compenser la perte d'énergie vitale et reposent sur des mécanismes physiologiques, métaboliques et moléculaires. Des progrès ont été accomplis dans la compréhension des mécanismes transcriptionnels déclenchés par l'hypoxie, mais le mécanisme sous-jacent de détection de l'oxygène demeure obscur (Bunn et Poyton, 1996). Des mécanismes faisant intervenir la NADPH oxydase, le cytochrome P₄₅₀ et une protéine hémique se liant à l'oxygène (Acker, 1994; Fandrey et al., 1990) ont été proposés. La formation des ROS par des mitochondries au site ubisemiquinone (Boveris et al., 1972; Turrens et al., 1985) et une modification du potentiel mitochondrial d'oxydoréduction au cours de l'hypoxie pourraient altérer la production de ROS. On sait que ces mécanismes entrent en jeu dans d'autres réponses transcriptionnelles (Schreck et al., 1991).

Des données indiquent que l'induction de gènes par l'hypoxie ne fait pas toujours appel à ces mécanismes, ce qui suggère qu'il existe d'autres voies de signalisation qui n'ont pas encore été caractérisées (Ebert et al., 1995; Wood et al., 1996). En fait, on a observé que l'ischémie, et plus particulièrement l'hypo-oxygénation du cerveau (Munell et al., 1994), des reins (Megyesi et al., 1995; Ouellette et al., 1990; Safirstein et al., 1990), du foie (Schlossberg et al., 1996) ou du cœur (Wechsler et al., 1994) entraînait l'expression de certains gènes précoces immédiats tels que c-jun, c-fos ou EGR-1. Il est certain que l'ischémie et la réoxygénation produisent des effets cellulaires et, par conséquent, il est difficile d'établir si l'induction de gènes précoces immédiats dans ces cas, faisait directement intervenir une chute de la tension tissulaire en oxygène, comme c'est le cas pour les gènes classiques induits par l'oxygène, tels que l'érythropoïétine (Jelkmann et al., 1992), ou d'autres voies. Il existe peu de données sur les effets d'une hypo-oxygénation tissulaire moins radicale découlant d'une hypoxie systémique sur l'expression tissulaire des gènes immédiats. Dans les pages qui suivent, nous allons rappeler les systèmes de détection de l'oxygène les plus importants intervenant dans la transcription des gènes induits par l'hypoxie et l'ischémie.

4.2.1. Le facteur induit par l'hypoxie-1 (HIF-1)

L'adaptation à l'hypoxie est d'une importance fondamentale dans les processus développementaux, physiologiques et physiopathologiques (Bunn et al., 1996; Guillemin et Krasnow., 1997). Les humains et d'autres mammifères répondent à une faible tension en oxygène en partie par une régulation fine de l'expression d'un groupe de gènes importants sur le plan physiologique. L'érythropoïétine (Jelkmann, 1992; Semenza, 1994) et la tyrosine hydroxylase (Czyzyk-Krzeska et al., 1994) agissent de concert, pour élever les concentrations sanguines d'oxygène, en favorisant respectivement l'érythropoïèse et la ventilation. L'induction hypoxique des gènes encodant pour le VEGF (Shweiki et al., 1992) et la NO synthase inductible (Melillo et al., 1995; Milillo et al., 1997) accroît l'angiogenèse et la vasodilatation. La stimulation de l'expression des gènes encodant le transporteur du glucose et des isoenzymes glycolytiques spécifiques (Firth et al., 1994; Firth et al., 1995; Semenza et al., 1994) maximisent la production d'ATP dans le contexte d'un apport réduit en oxygène. Fait remarquable, l'induction hypoxique de tous ces gènes semble reposer sur le même mode de détection de l'oxygène et de transduction de signal, activant un facteur de transcription crucial, le facteur induit par l'hypoxie-1 (HIF-1) (voir la figure 7), un hétérodimère formé de deux sous-unités ayant un domaine PAS (PER-ARNT-SIM) et un domaine basique à motif hélice-boucle-hélice (bHLH), HIF-1 α et HIF-1 β , également appelé ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) (Wang et al., 1995).

4.2.1.1. Processus de détection et signalisation de HIF-1

Il a été démontré que ce facteur rétablissait l'homéostasie de l'oxygène aux niveaux cellulaire, local et systémique. L'activation du facteur HIF-1 par l'hypoxie dépend d'un processus de détection et de signalisation encore mal compris. Il y a de fortes indications que le détecteur d'oxygène soit une protéine hémique (Bunn et Poyton, 1996; Goldberg et al., 1988) qui, à l'état désoxygéné ou substitué par le cobalt, déclenche une série d'événements menant à l'activation du facteur de transcription HIF-1 (Wang et Semenza., 1993), lequel se lie ensuite à une séquence activatrice spécifique (Pugh et al., 1991) et stimule par le fait même l'activité transcriptionnelle.

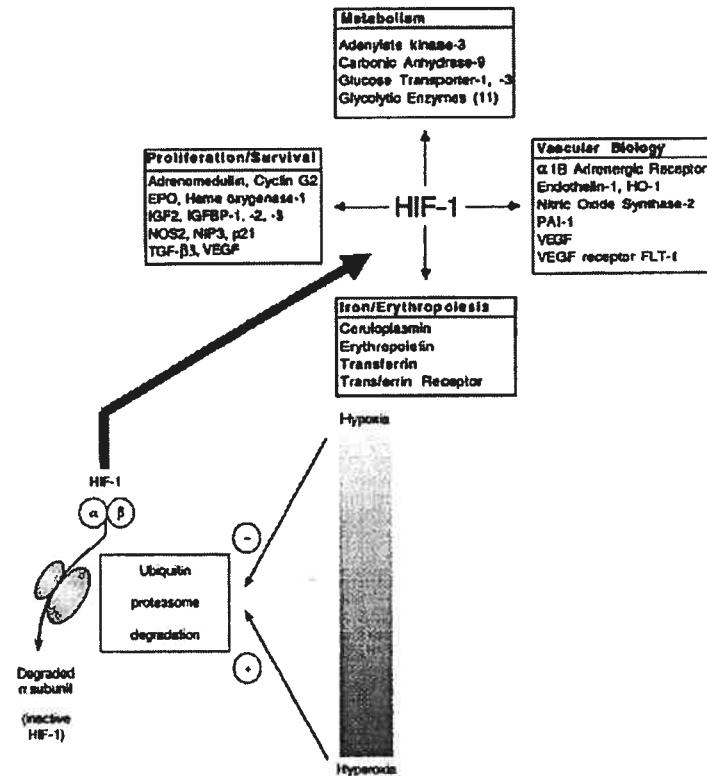


Figure 7. Processus d'adaptation à l'hypoxie. [Figure modifiée d'après Johnston et ses collaborateurs (2003) et Semenza (2001)].

En plus de son rôle dans l'homéostasie de l'oxygène, le HIF-1 constituerait un facteur crucial dans la pathogenèse de la vascularisation tumorale, l'ischémie myocardique et l'AVC, en raison de son rôle régulateur dans l'hypoxie tissulaire localisée qui prévalent dans ces conditions. Lahiri et ses collaborateurs (2002) proposent également un modèle des effets hypoxiques et des réponses de toutes les cellules sensibles à l'oxygène, prenant en compte le HIF-1 et le NADH/NADPH (voir la figure 8). Selon Lahiri (2002), la détection d'oxygène se produit instantanément à la membrane plasmique et fait intervenir des canaux ioniques et des protéines hémiques.

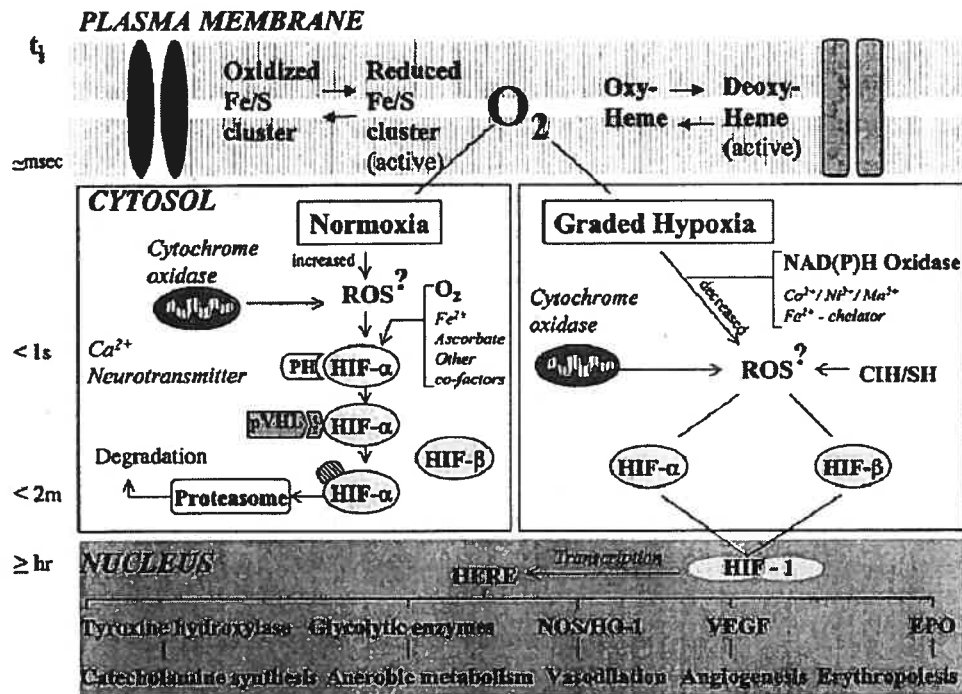


Figure 8. Modèle d'hypoxie de cellules sensibles à l'oxygène (Lahiri et al., 2002)

La détection d'oxygène se produira ensuite au niveau intracellulaire, par l'entremise de la chaîne respiratoire mitochondriale ou, probablement, de la formation de ROS. La formation de ROS par l'intermédiaire du NADH/NADPH est inhibée par les chélateurs du Fe^{2+} ainsi que par le Co^{2+} , le Ni^{2+} et le Mn^{2+} . Le HIF-1 α nouvellement synthétisé sera stabilisé en hypoxie et passera dans le noyau par translocation, avant de se dimériser avec des sous-unités HIF-1 β pour former le HIF-1. Ce dernier se fixe ensuite à la séquence HRE (Hypoxia Response Element) et stimule l'expression de différents gènes (p. ex., EPO, VEGF, NOS/HO-1, enzymes glycolytiques, TH). La stimulation de l'expression de ces gènes fait également intervenir l'activation d'un petit nombre d'autres facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire kappa B (NF-kB), la protéine activatrice-1 (AP-1) ou le facteur de suppression des tumeurs p53 (Ravi et al., 2000; Semenza, 1999).

Il a récemment été suggéré que le HIF-1 α pouvait être modifié par oxydation par des ROS et que ces interactions à courte distance nécessitaient la participation de prolyl hydroxylases qui pourraient être en cause dans la détection de l'oxygène (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Zhu et Bunn, 2001). L'enzyme de modification du HIF-1 α dépend apparemment de l'oxygène et du fer (Kivirikko et Pihlajaniemi, 1998). Zhu et Bunn

(2001), ainsi que Semenza (2001), ont proposé des modèles de régulation dépendant de l'oxygène du facteur de transcription HIF-1 α faisant intervenir l'hydroxylation d'une proline particulière, à l'intérieur d'une région hautement conservée du domaine de dégradation dépendante de l'oxygène du HIF-1 α (ODD). Cette modification structurale est nécessaire à la liaison du HIF-1 α à la protéine pVHL (produit du gène de suppression de tumeur mis en cause dans la maladie de Von Hippel-Lindau). Pour être dégradé par le protéasome, le facteur de transcription HIF-1 α doit se lier à l'ubiquitine et cette fixation nécessite une liaison directe au domaine α de la pVHL (Ohh et al., 2000). En situation de normoxie, le HIF-1 α subit une dégradation rapide par la voie ubiquitine-protéasome, avec formation d'un complexe E3 ligase (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Durant l'hypoxie, le HIF-1 α échappe à la dégradation parce que la proline n'est pas hydroxylée.

4.2.1.2. Le HIF-1 dans l'ischémie cérébrale

Weiner et ses collaborateurs (1996), ont établi que les ARNm du HIF-1 α atteignaient leur concentration maximale dans le foie et le rein une heure après l'induction de l'hypoxie chez la souris (O₂ à 6 % pendant une à deux heures) et revenaient aux valeurs initiales dans les quatre heures suivantes. Dans le cerveau, les valeurs correspondantes étaient de cinq heures et douze heures.

Sharp et ses collaborateurs (2001) ont montré qu'une ischémie cérébrale focale permanente stimulait l'expression de l'ARNm du HIF-1 α et augmentait les concentrations des deux sous-unités, HIF-1 α et HIF-1 β . On a observé une forte augmentation de l'ARNm du HIF-1 α 7,5 heures après l'occlusion de l'ACM, alors que les taux d'ARNm du HIF-1 β étaient sensiblement réduits durant la même période. Une autre étude a montré une stimulation de l'expression du HIF-1 α en l'espace d'une heure (Bernaudin et al., 2002). L'augmentation du HIF-1 se limitait au tissu entourant l'infarctus ischémique et aux régions adjacentes irriguées par les artères cérébrales antérieure et postérieure. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'hypoxie tissulaire, découlant d'une baisse modérée du débit sanguin cérébral, provoquait l'induction du HIF-1 dans la zone de pénombre. Il a été démontré que la synthèse de l'ARNm du HIF-1 α , mais non celui du HIF-1 β , présentait une augmentation similaire dans la rétine ischémique (Ozaki et al., 1998) et le cerveau de la souris après une ischémie globale (Kin et al., 2000). Bien qu'il y ait eu une induction marquée de l'ARNm du HIF-1 α après un AVC, le taux de HIF-1 α n'était que modérément

augmenté, ce qui pourrait indiquer une traduction inadéquate. Les auteurs ont constaté qu'il n'y avait pas induction des ARNm du HIF-1 et des protéines correspondantes dans les régions du territoire de l'ACM où se constitue l'infarctus, vraisemblablement parce que le débit sanguin dans les régions centrales était réduit à un niveau incompatible avec la transcription ou la traduction (Kinouchi et al., 1993).

Après une occlusion permanente de l'ACM chez le rat, on observe une induction temporelle et spatiale conjointe de l'ARNm du HIF-1 α et des ARNm de différents gènes cibles (Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998). L'expression de ces ARNm est localisée dans la zone de pénombre, ce qui semble indiquer que l'induction de l'angiogenèse et du métabolisme glycolytique par le HIF-1 pourrait être importante pour la survie des neurones (Bergeron et al., 1999; Marti et al., 2000).

Chez des rats soumis à une hypoxie et à une occlusion unilatérale permanente de l'ACM, l'expression du HIF-1 α est augmentée dans tout le cortex controlatéral tandis que du côté de la lésion, elle est réduite dans le parenchyme et fortement accrue dans les vaisseaux nourriciers corticaux de calibre moyen (Bergeron et al., 2000). D'autres études sont nécessaires pour établir les conséquences de l'expression du HIF-1 dans les cellules gliales, neuronales, inflammatoires et vasculaires ischémiques *in vivo* et le rôle du HIF-1 dans la facilitation ou la prévention de l'infarctus cérébral après une occlusion artérielle.

Des études récentes semblent indiquer que le HIF-1 agit comme médiateur dans le préconditionnement provoqué par l'hypoxie dans le cerveau (Bergeron et al., 2000; Ruscher et al., 1998; Zaman et al., 1999), ce qui suggère que l'EPO joue un rôle dans le préconditionnement ischémique.

4.2.2. Le NADH/NADPH

Les NADH/NADPH oxydases sont une famille de complexes enzymatiques à multiples sous-unités qui oxydent le NADPH ou le NADH et génèrent un superoxyde par transfert d'un électron non apparié à l'oxygène (Schumacker, 2003). La NADPH oxydase, principalement située dans la membrane plasmique des cellules, est reconnue comme étant un des principaux complexes enzymatiques responsables de l'action antipathogène des polynucléaires neutrophiles et d'autres leucocytes phagocytaires. Cette action fait intervenir la production de formes radicalaires d'oxygène, communément appelées dérivés oxygénés

(ROS) ou espèces actives de l'oxygène, qui sont libérées dans le phagosome en formation (Dimagl et al., 2003).

4.2.2.1. Mécanisme de production d'anions superoxydes

La production d'anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) par la NADPH oxydase a été proposée par Janoff (1964), ainsi que par Chen et Simon (1997) (voir la figure 9). Les anions superoxydes sont convertis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) de manière spontanée ainsi que sous l'action de la superoxyde dismutase. D'autres interactions avec les anions superoxydes mènent à la formation de radicaux hydroxyles toxiques (OH^{\cdot}). La principale sous-unité de la NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles, gp91phox, a récemment été mise en évidence dans diverses cellules de mammifères, en étroite association avec les processus de détection de l'oxygène et est capable de produire des ROS en réponse à des modifications de la concentration d'oxygène, la principale caractéristique de tout «détecteur» d'oxygène (Dimagl et al., 2003).

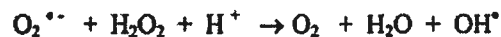
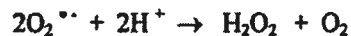


Figure 9. Production de radicaux superoxyde à partir du NADPH. (Dimagl et al., 2003)

4.2.2.2. Le NADPH dans l'ischémie cérébrale

Il a été établi que la production de superoxydes, par l'entremise de la NADPH oxydase, jouait un rôle dans la neurotoxicité et l'AVC ischémique. De plus, elle pourrait être nécessaire aux fonctions cérébrales normales, y compris la différenciation et la plasticité neuronales (Serrano et al., 2003).

L'induction de la NADPH après un infarctus ischémique a été étudiée par Peng et ses collaborateurs, en 1996. Une occlusion distale de l'ACM a été pratiquée chez des rats; les observations recueillies après 1, 2, 7 et 14 jours indiquent que l'induction de la NADPH a eu lieu dans les neurones, les astrocytes, les macrophages et les cellules endothéliales.

Un, deux et sept jours après l'ischémie, une faible positivité a été observée dans les neurones pyramidaux des aires corticales adjacentes à la zone nécrosée. Les astrocytes à la périphérie de la zone nécrosée étaient hypertrophiques et certains d'entre eux exprimaient la NADPH. Un et deux jours après l'occlusion de l'artère, de nombreux macrophages présentant une positivité d'intensité variable pour la NADPH étaient visibles à la périphérie de la zone nécrosée et dans la capsule externe de l'hémisphère cérébral ischémique.

Green et ses collaborateurs (2001), ont mis en évidence une neuroprotection importante contre les lésions neuronales après une ischémie cérébrale transitoire chez des souris dont le gène gp91-phox avait été inactivé, ce qui laisse supposer que cette enzyme joue un rôle déterminant dans l'AVC ischémique. Selon une autre étude réalisée par les mêmes auteurs (Walder et al., 1997), au moyen d'une occlusion transitoire de l'ACM chez la souris, les cellules de la microglie contiendraient une NADPH oxydase fonctionnellement active capable de produire des ROS durant une inflammation du système nerveux central (SNC).

Serrano et ses collaborateurs (2003), ont détecté des composantes protéiques de la NADPH oxydase membranaire, plus précisément p22 et gp91, dans des neurones de tout le cerveau de la souris. Chacune des protéines de la NADPH oxydase a été mise en évidence par immunocytochimie dans les neurones de toutes les régions du névraxe, et plus particulièrement, dans l'hippocampe, le cortex, l'amygdale, le striatum et le thalamus. L'expression de la NADPH oxydase dans les neurones laisse penser que cette enzyme pourrait jouer un rôle dans le cerveau, tant dans le fonctionnement neuronal normal que dans la neurodégénérescence (Serrano et al., 2003).

Dans le cadre d'une étude du rôle du récepteur de l'angiotensine II dans un modèle d'ischémie cérébrale focale chez le rat diabétique, Kusaka et ses collaborateurs (2004), ont découvert que l'occlusion de l'ACM produisait un infarctus cérébral typique et des déficits neurologiques accompagnés d'une élévation des ARNm des composantes gp91 et p22 de la NADPH oxydase et de la production d'hydroperoxydes lipidiques dans l'hémisphère ipsilatéral.

4.2.3. Les mitochondries

Les tissus dépendent de l'énergie produite par phosphorylation oxydative des mitochondries et montrent ainsi une vulnérabilité aux dommages induits par un manque en oxygène et/ou de substrats métaboliques. Les mitochondries, en plus de la phosphorylation

oxydative, régularisent la signalisation du Ca^{++} , la production de radicaux libres et le relâchement de facteurs qui induisent l'apoptose (Dzeja et al., 2001).

4.2.3.1. Mécanisme de détection de l'oxygène par les mitochondries

Les mitochondries ont été longtemps considérées comme un site potentiel de détection de l'oxygène, parce qu'elles constituent le principal lieu de consommation de l'oxygène et qu'elles ont une forte affinité pour ce dernier. Une étude récente montre que les mitochondries pourraient jouer un rôle dans les voies de signalisation intracellulaire et participer à la détection de l'oxygène (Budinger et al., 1998). Certaines expériences ont permis de mettre en évidence une protéine hémique se fixant au monoxyde de carbone (CO), probablement située dans la membrane plasmique et ayant une faible affinité pour l'oxygène, mais une forte affinité pour le CO. Les mêmes expériences ont prédit l'existence d'une autre protéine hémique mitochondriale, ayant une affinité plus élevée pour l'oxygène et plus faible pour le CO (Acker, 1994; Hochachka et al., 1996). D'autres observations ont confirmé que la mitochondrie pouvait agir comme un détecteur d'oxygène (Chandel et al., 1998; Chandel et al., 2000; Chander et Schumacker, 1999; Chander et Schumacker, 2000; Duranteau et al., 1998; Waypa et al., 2001). Chandel et ses collègues (2000), ont rapporté que les ROS mitochondriales jouent un rôle majeur dans la régulation du HIF-1 α . Selon la description de ces auteurs, l'hypoxie augmente la production mitochondriale de ROS au complexe III, ce qui cause l'accumulation de la sous-unité HIF-1 α , laquelle déclenche l'expression d'un gène rapporteur luciférase régulé par une séquence HRE (Hypoxic Response Element).

4.2.3.2. Les mitochondries dans l'ischémie cérébrale

Les mitochondries jouent un rôle central dans la mort neuronale au cours de l'ischémie cérébrale (Ankarcrona et al., 1995; Bernardi, 1996; Kroemer et al., 1998; Ouyang et al., 1999; Wadia et al., 1998). On a montré qu'une altération des mitochondries contribuait à la mort neuronale dans les maladies neurodégénératives (Beal, 1992; Beal et al., 1993; Frim et al., 1993; Mattson et al., 1993; Mutisya et al., 1994). Une atteinte mitochondriale a été mise en cause dans l'apoptose expérimentale provoquée par le TNF- α (Schulze-Osthoff et al., 1992), l'inhibition de la réplication de l'ADN mitochondrial (Baixera et al., 1994) et les agents pro-oxydants tels que le H_2O_2 (Richter, 1993).

Récemment, des expériences effectuées dans des systèmes acellulaires ont montré que des facteurs mitochondriaux étaient essentiels à l'apoptose (Newmeyer et al., 1994), ce qui est compatible avec l'intervention des mitochondries dans la signalisation accompagnant ce processus. Les protéines Bcl-2 et Bax, toutes deux mises en évidence dans la membrane des mitochondries, ont été observées dans la zone frontière des infarctus cérébraux (Schroeter et al., 2001). Enfin, la plupart des ROS produites par les mitochondries sont nuisibles pour les neurones après une ischémie cérébrale focale (Siesjo, 1992a). Récemment, Yoshimoto et ses collaborateurs (2002), ont découvert que le NXY-059, une nitrone agissant comme piège à radicaux libres, inhibait la libération du cytochrome C des mitochondries, après une ischémie cérébrale focale. La libération du cytochrome C facilite l'apoptose via l'activation des caspases, et parfois même jusqu'à la nécrose, confirmant ainsi un rôle important de la mitochondrie dans l'ischémie cérébrale.

4.2.4. Le cytochrome P₄₅₀

Les enzymes du cytochrome P₄₅₀ sont une famille de hème protéines multifonctionnelles localisées dans les microsomes (Liu et al., 2004). Elles sont impliquées dans le métabolisme de plusieurs xénobiotiques, elles catalysent la formation de molécules de signalisation lipidique tels les eicosanoïdes et hormones stéroïdes et elles jouent un rôle majeur dans l'adaptation cellulaire aux stress oxydatifs.

Mécanisme de détection de l'oxygène par les cytochromes P₄₅₀

Outre les modèles de détection de l'oxygène susmentionnés, des études pharmacologiques effectuées par Fandrey et ses collègues (1990), semblent indiquer que le détecteur d'oxygène pourrait comprendre une oxydase à fonction mixte microsomiale. En se basant sur ces études, on a émis l'hypothèse que pour l'EPO, la détection de l'oxygène fait intervenir une interaction entre le cytochrome P₄₅₀ et sa réductase, ce qui permet la conversion de l'oxygène moléculaire en radicaux libres, l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Bunn et Poyton., 1996; Fandrey et al., 1990; Wender et Gassmann., 1997). En 2001, Naldini et ses collaborateurs ont montré que de nombreuses cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, le TNF- α et l'IFN- γ , ainsi que l'EPO (Lacombe et Mayeux, 1999), contribuaient aux changements affectant le cytochrome P₄₅₀.

4.3. Observations cliniques des cas d'hypoxémie chez les victimes d'AVC : causes possibles

L'hypoxémie est une complication de l'accident vasculaire cérébral (AVC) et cet événement indésirable a été associé à un pronostic défavorable. Pour cela, les lignes directrices de pratique clinique recommandent le traitement de l'hypoxie systémique, sans toutefois préciser quel degré d'hypoxie doit être considéré comme anormal et exiger un traitement (Adams et al., 2003). Le traitement excessif a été associé à des effets défavorables sur l'évolution de l'état du patient (pour revue, voir Ronning et Guldvog, 1999).

Normalement, la pression partielle en oxygène (PaO_2) varie entre 71 et 104 mm Hg tandis que la saturation du sang artériel en oxygène (SaO_2) est de 95 à 98,5 %. Une PaO_2 inférieure à 38 mm Hg durant au moins trois à cinq minutes peut provoquer des lésions cérébrales graves et permanentes; alors que si l'hypoxie apparaît graduellement et que le sujet a une pression sanguine normale, une PaO_2 de 23 mm Hg ne mène pas nécessairement à une perte de conscience, ni à des lésions cérébrales irréversibles (Simon, 1999). Certaines régions du cerveau moins bien irriguées (pallidum, cervelet, hippocampe et zones adjacentes aux lobes pariéto-occipitaux) peuvent être affectées à un degré moindre par l'hypoxie systémique. Les sujets souffrant d'une hypoxie légère ont une $\text{PaO}_2 \leq 70$ mm Hg et une $\text{SaO}_2 \leq 94$ %. Une $\text{PaO}_2 \leq 60$ mm Hg et une $\text{SaO}_2 \leq 91$ % définissent une hypoxie systémique modérée et une $\text{PaO}_2 \leq 50$ mm Hg et une $\text{SaO}_2 \leq 85$ %, une hypoxie systémique grave (Roffe, 2001). Les symptômes de l'hypoxie systémique sont un retard d'adaptation à l'obscurité, une altération du jugement, une incapacité à accomplir des tâches et une perte de la mémoire à court terme (Blass et Gibson, 1979). Ces symptômes peuvent se manifester chez des victimes d'AVC à un taux de saturation en oxygène plus élevé (Demet et al., 2000).

Les sujets souffrant d'ischémie cérébrale aiguë peuvent présenter une hypoxie systémique pour diverses raisons (Elizabeth et al., 1993; Fluck, 1966; Houston et al., 1995; McMahan et Heyman, 1974; Walshaw et Pearson, 1984). Les causes directement liées à l'AVC comprennent une faiblesse des muscles respiratoires du côté atteint d'hémiplégie (De Troyer et al., 1981; Fluck, 1966; Hass et al., 1967; Houston et al., 1995), une altération de la régulation centrale de la respiration, une apnée du sommeil et des complications de l'AVC, telles que l'aspiration, les infections des voies respiratoires, l'embolie pulmonaire

et l'œdème pulmonaire neurogène. En outre, des problèmes pulmonaires et cardiovasculaires pré-existants peuvent prédisposer à l'hypoxie systémique. La dysphagie est un autre problème courant après l'AVC et survient chez environ 30 à 50 % des sujets. L'hypoxie systémique liée à l'aspiration fait intervenir des réactions réflexes des systèmes nerveux sympathique et parasympathique menant à une perturbation du rapport ventilation/irrigation (Colebatch et Halmagyi, 1962). La position du corps pourrait également prédisposer les victimes d'AVC à l'hypoxie systémique. On croit qu'en présence d'une faiblesse du diaphragme, l'oxygénation sera plus efficace en position verticale (assise, debout) qu'en position allongée. Des études ont montré un accroissement de la saturation en oxygène (d'environ 1 %) en position verticale, comparativement aux autres positions (Elizabeth et al., 1993; Rowat et al., 1998).

La fonction respiratoire est régulée par différents éléments du cerveau qui s'étendent du cortex cérébral jusqu'aux noyaux ponto-médullaires. Les régions du cortex qui comprennent la partie antérieure de la 5^e circonvolution temporale, le lobe temporal, l'insula et le gyrus limbique, interviennent dans la régulation de la respiration (Vingerhoets et Bogousslavsky, 1994). Le cortex exerce un effet inhibiteur sur la respiration au repos et une lésion ou un infarctus entraîne une augmentation de la fréquence respiratoire (Roffe, 2001). Par exemple, la respiration de Cheyne-Stokes (variété spéciale de rythme respiratoire, caractérisée par une période d'apnée plus ou moins longue, à laquelle succède une série de respirations d'amplitude croissante, suivie d'une autre série de respirations d'amplitude décroissante, aboutissant à une nouvelle pause) est très souvent observée dans les lésions corticales bilatérales, mais elle peut survenir en présence de lésions unilatérales ou même en l'absence de lésions cérébrales dans le contexte d'une maladie cardiovasculaire (Lee et al., 1974; Vingerhoets et Bogousslavsky, 1994; Yajima et al., 1994). Les lésions du tronc cérébral diminuent la fréquence respiratoire et les lésions du bulbe rachidien provoquent de l'apnée (Roffe, 2001). E.J. van Dijk et ses collaborateurs (2004), ont étudié l'association entre la SaO₂ et les lésions de la substance blanche et les infarctus lacunaires, chez les patients souffrant de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), une affection courante chez les personnes âgées (Soriano et al., 2000; Lange et al., 1989; Lacasse et al., 1999; Pena et al., 2000). Les patients atteints de MPOC ont un apport réduit en oxygène pendant de longues périodes, en particulier durant un effort physique, les exacerbations de la maladie et le sommeil (Chaouat et al., 2001; Plywaczewski et al., 2000). Ces sujets présentaient des lésions de la substance blanche

périvericulaire plus graves que celles du groupe témoin (sans MPOC). Van Dijk a conclu que les valeurs plus faibles de SaO_2 , en présence de MPOC, n'étaient pas associées à des lésions de la substance blanche sous-corticale ni à des infarctus lacunaires, mais à de plus graves lésions de la substance blanche périvericulaire.

4.4. Distinctions entre hypoxie systémique intermittente et hypoxie systémique chronique

4.4.1. Effets d'une hypoxie systémique intermittente

L'évaluation de l'oxygénation chez les victimes d'AVC devraient être effectuée, non seulement durant la journée, mais aussi la nuit parce que plus de 25 % des sujets ayant une oxygénation normale durant le jour souffriront d'importants épisodes hypoxiques nocturnes pendant le sommeil (Roffe et al., 2003; Roffe et Sills, 2000). La prévalence des troubles respiratoires liés au sommeil chez les patients ayant subi un AVC va de 59 % à 95 % (Bassetti et Aldrich., 1999; Dyken et al., 1996; Good et al., 1996; Harbison et al., 2000; Kapen et al., 1991; Mohsenin et Valor., 1995; Nasr-Wyler et al., 1999; Parra et al., 2000; Sandberg et al., 2001; Wessendorf et al., 2000). L'apnée du sommeil est considérée par certains auteurs soit comme un facteur de risque ou une conséquence de l'AVC (Parra et al., 2004). L'impact de l'apnée du sommeil sur la santé du public est énorme et une mortalité accrue a été observée chez des sujets non traités (Mohsenin, 2004). De plus, une étude conduite aux Etats-Unis par Sahar et ses collaborateurs (2001) a démontré une forte association entre l'apnée du sommeil et les maladies cérébrovasculaires. L'apnée du sommeil peut prendre trois formes : apnée d'origine obstructive ou hypopnée avec effort respiratoire, apnée d'origine nerveuse centrale ou hypopnée sans effort respiratoire et forme mixte. Dans la plupart des cas, l'apnée suivant un AVC est mixte ou obstructive et moins de 10 % des cas sont purement d'origine centrale (Bassetti et Aldrich, 1999; Nasr-Wyler et al., 1999).

Par conséquent, chez la majorité des gens, il est plus courant d'observer des épisodes récurrents d'hypoxie qu'une hypoxie soutenue. Les réactions aiguës à l'hypoxie qui se produisent en quelques secondes ou minutes dépendent entièrement de la sensibilité à l'oxygène des chémorécepteurs artériels périphériques, en particulier le glomus carotidien (les cellules du glomus sont considérées comme les principales cellules responsables de la détection de la teneur en oxygène) (Prabhakar, 2000). S'il s'agit d'une hypoxie soutenue (de quelques heures à quelques jours), presque toutes les cellules de mammifères y

répondent en modifiant l'expression génique et la synthèse de protéines *de novo* (Bunn et Poyton, 1996; Semenza, 2000a; Semenza, 2000b). Jusqu'à récemment, la plus grande partie de l'information sur les effets à long terme d'une hypoxie intermittente provenait d'études menées chez des sujets humains victimes d'apnées récurrentes chroniques. La mise au point récente de modèles animaux d'hypoxie intermittente (Bach et Mitchell, 1996; Cao et al., 1992; Fletcher, 2000; Fletcher et al., 1992; Greenberg et al., 1999; Prabhakar, 2001; Peng et al., 2002; Peng et al., 2003) et de techniques permettant d'exposer des cellules en culture à des cycles successifs d'hypoxie, a permis d'obtenir de nouvelles données sur les effets d'une hypoxie épisodique sur les mécanismes de détection de l'oxygène par les chémorécepteurs du glomus carotidien (Prabhakar, 2000) et la régulation de l'expression génique. Chez le rongeur, l'hypoxie intermittente chronique accroît sélectivement la sensibilité des chémorécepteurs du glomus carotidien à une baisse de la tension en oxygène (Peng et al., 2002; Peng et al., 2003).

Selon des études récentes effectuées dans un modèle d'hypoxie intermittente chez le rat, les caractéristiques de l'hypoxie joueraient un rôle crucial dans l'accroissement de l'activité des chémorécepteurs périphériques ainsi que dans l'apparition de l'hypertension (Bach et Mitchell, 1996). Ainsi, si l'on expose des rats à une hypoxie intermittente (15 secondes à 5 % d'O₂ suivies de 5 minutes à 21 % d'O₂; 8 heures/jour pendant 10 jours), il s'ensuit une augmentation marquée de l'activité des chémorécepteurs périphériques, une hausse de la tension artérielle et une activité sympathique. À l'inverse, l'exposition d'animaux à une hypoxie soutenue pendant une durée cumulative comparable n'a pas entraîné ces altérations cardiovasculaires. Fait plus intéressant encore, une hypoxie intermittente chronique produit également une nouvelle forme de plasticité du glomus carotidien, menant à une facilitation à long terme de la décharge sensorielle (Peng et al., 2002; Peng et al., 2003). Des études réalisées sur des cellules en culture révèlent que l'hypoxie intermittente est plus efficace que l'hypoxie soutenue dans l'activation de deux facteurs de transcription : la protéine activatrice-1 (AP-1) (Premkumar et al., 2000; Adhikary et al., 2001) et le facteur induit par l'hypoxie-1 (HIF-1) (Yuan et al., 2004). En outre, selon certaines données, l'hypoxie intermittente et l'hypoxie soutenue feraient intervenir des voies de signalisation intracellulaires différentes (Prabhakar et al., 2001).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites durant la phase de réoxygénation de l'hypoxie intermittente pourraient jouer un rôle clé dans les effets de l'hypoxie intermittente sur la fonction et l'expression génique du glomus carotidien (Peng

et al., 2002; Peng et al., 2003). Il a été suggéré que l'hypoxie épisodique représentait une forme de stress oxydatif et que les ROS générées durant les épisodes récurrents d'hypoxie intermittente reproduisaient presque la phase de réoxygénation du modèle animal d'ischémie-reperfusion (Prabhakar, 2002). L'analyse des profils géniques de cellules en culture semble indiquer que certains gènes sont sélectivement régulés par l'hypoxie intermittente, dans certains cas, à la hausse (choline kinase, transporteur du glucose, récepteurs de l'endothéline B, etc.) et dans d'autres cas, à la baisse (cyclo-oxygénases, cytochrome c oxydases et récepteur D1 de la dopamine) (Premkumar et al., 2000; Prabhakar, 2001).

Ces études suggèrent que l'hypoxie intermittente est un stimulus plus efficace que l'hypoxie soutenue et soulignent le fait que les effets de l'hypoxie peuvent être profondément différents selon qu'elle est répétitive ou continue. La principale différence entre les formes intermittente et continue d'hypoxie est la réoxygénation épisodique qui se produit dans la première, mais non dans la seconde. Sous ce rapport, l'hypoxie intermittente ressemble à l'ischémie-reperfusion.

4.4.2. Effets d'une hypoxie systémique soutenue

Chez des sujets normaux, le débit sanguin cérébral peut augmenter jusqu'à 500 % par vasodilatation pour contrebalancer l'effet d'un faible taux de saturation en oxygène (Ori et Ceschin, 1994). Toutefois, chez les personnes subissant un AVC, où une réduction de la pression de perfusion constitue le problème principal, la zone ischémique est incapable de compenser la légère hypoxie systémique et ces sujets sont plus susceptibles de voir leur état s'aggraver (Back et al., 1994). Ainsi, on a montré dans des essais cliniques que chez des victimes d'AVC présentant une hypoxie systémique légère (SaO_2 inférieure à 90 %) pendant 72 heures après leur admission à l'hôpital, les signes neurologiques avaient deux fois plus de chances de s'aggraver (Silva et al., 2001). La même étude révèle une bonne corrélation entre la durée de l'hypoxie systémique légère (SaO_2 inférieure à 90 %) chez les victimes d'AVC et la mortalité à un an. Les effets nuisibles de l'hypoxie systémique peuvent également affecter le processus de réadaptation après la phase aiguë de la maladie. Il a été démontré qu'une hypoxie systémique légère (SaO_2 inférieure à 93 %) avait un effet sur l'attention et la concentration (Halim et Roffe., 2001).

4.5. Effets de l'hypoxémie sur les globules rouges, la tension artérielle pulmonaire et le poids corporel

Les principales conséquences médicales de l'hypoxie chronique comprennent la polyglobulie, l'hypertension artérielle pulmonaire et la perte de poids, toutes associées à une forte hausse de la mortalité (Hultgren et Grover, 1968; Moraes et Loscalzo, 1997; Naeije, 1997). Des réactions physiologiques semblables sont observées chez des animaux de laboratoire soumis à des concentrations réduites d'oxygène ambiant (Dicarlo et al., 1995; Hales et al., 1983; Li et al., 1994; Ostadal et al., 1978; Rabinovitch et al., 1979; Widimsky et al., 1973). L'utilisation de techniques de ciblage de gènes a permis de déterminer la contribution de gènes particuliers à ces réactions (Steudel et al., 1998; Voelkel et al., 1996). La polyglobulie est attribuable à des concentrations plasmatiques accrues d'érythropoïétine, laquelle favorise la survie et la prolifération des cellules souches de la lignée érythrocytaire (Wang et Semenza, 1996). La physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire d'origine hypoxique est plus complexe et fait intervenir une vasoconstriction ainsi qu'une néomuscularisation et un épaississement de la média et de l'adventice des artéoles pulmonaires (Jin et al., 1989; Jones et Evans, 1997; Oka et al., 1993; Rabinovitch et al., 1979). Dans des conditions d'hypoxie chronique, une perte de poids peut refléter de multiples altérations de la fonction cardiovasculaire, de la production hormonale, du métabolisme énergétique et d'autres aspects de la physiologie des cellules et de l'organisme (Wang et al., 1995). Parmi les gènes inductibles par l'hypoxie contenant des sites importants de liaison du facteur HIF-1 sur le plan fonctionnel, se trouvent ceux de l'érythropoïétine (Semenza et Wang, 1992), de la transferrine (Rolfs et al., 1997), du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Forsythe et al., 1996; Liu et al., 1995), du récepteur 1 du VEGF (Gerber et al., 1997), de la NO synthase inductible (Melillo et al., 1995; Palmer et al., 1998), de l'hème oxygénase 1 (Lee et al., 1997) et de l'endothéline 1 (Hu et al., 1998). Les protéines correspondant à bon nombre de ces gènes ont été mises en cause dans l'apparition de polyglobulie ou d'hypertension artérielle pulmonaire en réponse à une hypoxie chronique (DiCarlo et al., 1995; Kourembanas et al., 1997; Le Cras et al., 1996; Li et al., 1994; Ou et al., 1998; Tuder et al., 1995).

4.6. Effets de l'hypoxémie sur le système sympathique

Les changements de tension en oxygène sont un puissant stimulateur du système nerveux sympathique, comme en témoigne l'augmentation du tonus sympathique général et régional (Calbert, 2003). La stimulation du système sympathique par l'hypoxie est actuellement considérée comme un mécanisme de défense permettant d'assurer l'apport en oxygène aux organes vitaux, en augmentant le débit cardiaque et en régulant la conductance régionale (Calbet, 2000; Duplain et al., 1999; Leuenberger et al., 1991; Rowell et al., 1989). À l'inverse, l'hypoxie provoque, soit directement, soit par ses effets métaboliques, une vasodilatation de la plupart des lits vasculaires, de sorte que le tonus sympathique devrait être accru pour éviter une vasodilatation exagérée et une hypotension (Hilton et Eichholtz, 1925; Laughlin et al., 1996; Rowell et al., 1989). Une activité sympathique accrue a également été rapportée chez les patients souffrant d'hypoxémie chronique (Heindl et al., 2001) ainsi que chez les patients atteints d'apnée du sommeil présentant une hypoxémie intermittente (Imadojemu et al., 2002).

4.7. Effets de l'hypoxémie sur l'inflammation

L'hypoxie systémique produit une réaction inflammatoire caractérisée par une augmentation des ROS, de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium des veinules, de la diapédèse des leucocytes et de la perméabilité vasculaire (Gonzalez et Wood, 2001; Wood et al., 1999a; Wood et al., 2000). L'inflammation est généralement amorcée par des médiateurs libérés des cellules périvasculaires activées qui produisent le gradient chimiotactique responsable de l'accumulation extravasculaire de leucocytes (Casillan et al., 2000; Steiner et al., 2001). Lors d'une étude des effets de la diapédèse des leucocytes et de la perméabilité vasculaire chez des rats conscients, Wood et ses collaborateurs (1999a et 1999b), ont découvert qu'une hypoxie systémique aiguë produisait des hausses rapides de l'adhésion des leucocytes dans la microcirculation mésentérique. L'adhésion des leucocytes provoquée par l'hypoxie était associée à une production accrue de ROS et était atténuée par une hausse des concentrations tissulaires de NO, ce qui suggère que les effets aigus de l'hypoxie sur les interactions leucocytes-endothélium pourraient être causés par une altération de l'équilibre entre les ROS et le NO.

Marti et ses collaborateurs (1998), ont découvert que l'hypoxie systémique modifiait la distribution du VEGF et de ses récepteurs chez la souris de façon différente dans les différents organes. Une analyse par hybridation *in situ* a révélé qu'un

sous-ensemble distinct de cellules à l'intérieur d'un organe donné, par exemple les cellules gliales et les neurones dans le cerveau, les cellules tubulaires dans le rein et les cellules de Sertoli dans les testicules, répondait au stimulus hypoxique par une expression accrue du VEGF. Toutefois, dans d'autres cellules où le VEGF est exprimé de manière constitutive dans le tissu adulte normal, par exemple les cellules épithéliales du plexus choroïde et des glomérules rénaux, l'expression du VEGF baisse en réponse à un stimulus hypoxique (Gerber et al., 1997; Kremer et al., 1997; Sandner et al., 1997).

4.8. Effets de l'hypoxémie sur la transmission synaptique

Un apport d'oxygène suffisant est crucial pour le maintien de la viabilité des neurones dans le système nerveux central. Entre le tiers et la moitié environ de l'oxygène consommé par le cerveau est utilisé pour la transmission synaptique, tandis que le reste est affecté à des fonctions végétatives exigeant de l'énergie, notamment le maintien du potentiel transmembranaire (Astrup et al., 1982). Ce besoin essentiel se reflète dans l'existence de seuils de viabilité liés à deux déterminants de l'acheminement de l'oxygène : le débit sanguin cérébral et la pression partielle en oxygène dans le tissu (PaO_2 tissulaire) (Hossmann, 1999; MacMillan et Siesjo, 1971). En plus de ces seuils de viabilité, des seuils plus élevés de débit et de PaO_2 tissulaire sont associés à la suppression réversible de la transmission synaptique (Branston et al., 1974; McPherson et al., 1986; van de Bor et al., 1999). Vraisemblablement, la suppression de l'activité électrique reflète des mécanismes compensatoires visant à équilibrer l'acheminement de l'oxygène et l'apport d'oxygène. Fowler et ses collaborateurs (2003), a découvert que l'hypoxie systémique découlant de l'occlusion de la carotide provoquait une dépression de la transmission synaptique dans l'hippocampe de rat.

4.9. Effets de l'hypoxémie sur l'expression des enzymes du cytochrome P_{450}

Des études récentes, menées par Fradette et ses collaborateurs (2003), ont montré qu'une hypoxie modérée entraînait une augmentation de l'expression de l'isoenzyme 3A6 du cytochrome P_{450} (CYP3A6). Ces études ont également montré qu'une hypoxie modérée réduisait la biotransformation hépatique des médicaments éliminés par l'entremise des isoenzymes CYP1A1 et CYP1A2. En outre, Fradette et ses collaborateurs (2002), suggèrent que plusieurs mécanismes contribuent aux changements affectant le cytochrome P_{450} , dont la libération de cytokines agissant comme médiateurs sériques (Fradette et du

Souich, 2004; voir aussi Naldini et al., 1997). Cette observation est appuyée par le fait que les cytokines peuvent provoquer des modifications de l'expression des gènes du cytochrome P₄₅₀ (Calleja et al., 1997; Calleja et al., 1998).

4.10. Effets bénéfiques d'épisodes non létaux d'hypoxie pour la tolérance ischémique

Pratiquement n'importe quel stimulus capable de causer une lésion à un organe peut, s'il est appliqué à un degré approchant du seuil dommageable (sans l'atteindre), activer des mécanismes endogènes de protection. La tolérance ischémique est un processus adaptatif par lequel un tissu devient plus résistant à une ischémie subséquente. La tolérance peut être obtenue par l'entremise de plusieurs stress sublétaux de préconditionnement appliqués avant l'ischémie, diminuant ainsi l'impact de stimulus ultérieurs plus graves (Hakim et Simon, 2004).

Sur le plan historique, on assume généralement que ce phénomène a été décrit pour la première fois dans le cœur (Murry et al., 1986), et plus tard dans le cerveau (Kitagawa et al., 1990). Cependant, comme le rappellent Hakim et Simon (2004), les premières expériences décrivant la tolérance ischémique du cerveau remontent probablement aux études de Dahl et Balfour (1964), qui ont montré qu'une pré-exposition du cerveau à l'anoxie protégeait contre l'exposition subséquente prolongée à cette anoxie. Beaucoup d'autres études ont été effectuées avec des modèles animaux, entre autres sur l'ischémie cérébrale totale ou focale chez le rat (Glazier et al., 1999; Gidday et al., 1994; Kirino et al., 1991; Kitagawa et al., 1990; Liu et al., 1992; Matsushima et Hakim, 1995; Nishi et al., 1993; Stagliano et al., 1999; Toyoda et al., 1997). Quelques études de la tolérance ischémique ont été réalisées chez la souris (Miller et al., 2001; Nawashiro et al., 1997; Prass et al., 2000). On a également étudié le préconditionnement ischémique *in vitro* dans des cultures de neurones, en reproduisant l'atteinte ischémique par un apport sublétal d'oxygène et une privation de glucose (Bruer et al., 1997; Khaspekov et al., 1998) ou au moyen d'inhibiteurs métaboliques (Weih et al., 1999a; Weih et al., 1999b).

La réduction de l'apport en oxygène pourrait constituer un des premiers signaux cellulaires menant à la tolérance. Ainsi, Bernaudin et ses collaborateurs (2002), ont montré que l'hypoxie provoquait une tolérance à l'égard de l'ischémie focale permanente chez la souris adulte. Une hypoxie normobare (8 % d'O₂ pendant des périodes différentes de un heure, trois heures ou six heures) appliquée 24 heures avant l'ischémie a réduit le volume de l'infarctus de plus de 20 % environ par rapport aux témoins. Au niveau

moléculaire, l'EPO pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de la tolérance ischémique induite par l'hypoxie, comme discuté plus loin dans le Chapitre 5.

4.11. Suivi médical et traitement de l'hypoxie systémique

Pour que le traitement de l'hypoxie tissulaire soit efficace, celle-ci doit être décelée tôt. La SaO_2 et la PaO_2 se mesurent facilement et demeurent les principaux indicateurs cliniques lorsqu'il s'agit d'entreprendre, de surveiller ou de modifier une oxygénothérapie. Cela dit, la PaO_2 et la SaO_2 peuvent être normales lorsque l'hypoxie tissulaire est causée par un faible débit cardiaque, une anémie et une incapacité du tissu à utiliser l'oxygène. Dans ces circonstances, la pression partielle en oxygène dans le sang veineux (PvO_2), mesurée dans le sang de l'artère pulmonaire, se rapproche de la PaO_2 tissulaire moyenne et constitue un meilleur indice de l'oxygénation du tissu (Bateman, 1998).

La prise en charge de l'hypoxie systémique ou de la détresse respiratoire peut nécessiter les mesures suivantes : rétablissement de la perméabilité des voies aériennes et correction de la position du sujet, retrait des médicaments causant la dépression respiratoire, traitement ou prévention des facteurs précipitants tels que l'aspiration, la pneumonie, le bronchospasme, l'embolie pulmonaire et l'insuffisance cardiaque, et enfin, l'oxygénothérapie.

On a rapporté qu'un traitement tel que l'oxygène hyperbare pouvait réduire la taille de l'infarctus dans des modèles animaux d'ischémie focale permanente ou réversible (Badr et al., 2001; Beltkamp et al., 2000; Chang et al., 2000; Reitan et al., 1990; Sunami et al., 2000; Weistein et al., 1987) et diminuer la mort neuronale après un arrêt cardiaque chez le chien (Rosenthal et al., 2003). En outre, l'oxygène hyperbare s'est révélé capable de provoquer une tolérance à l'égard de l'ischémie cérébrale focale chez la souris (Prass et al., 2000). Ce type de traitement peut également inhiber l'infiltration des polynucléaires neutrophiles selon Miljkovic-Lolic et ses collaborateurs (2003), qui étudiait l'effet neuroprotecteur de l'oxygène hyperbare chez le rat. De plus, Flynn et ses collaborateurs (2002), ont observé qu'une hypoxémie normobare améliorait les résultats neurologiques et neuropathologiques. Les autres traitements comprennent l'administration de stimulants respiratoires (aminophylline ou théophylline) (Mohiuddin et al., 2001).

4.12. Conclusion

Les organismes, les tissus et les cellules réagissent à l'hypoxie en déclenchant des réactions adaptatives visant à préserver le transport de l'oxygène dans l'organisme et son acheminement vers les cellules et à assurer la résistance des cellules aux conséquences d'une hypoxie profonde. Des mécanismes de détection de l'oxygène tels que le HIF-1, le NADPH oxydase, le cytochrome P₄₅₀, la mitochondrie, ont été proposés. En particulier, le HIF-1, aide à rétablir l'homéostasie de l'oxygène aux niveaux cellulaire, local et systémique, en régulant l'expression d'un groupe de gènes importants sur le plan physiologique, notamment l'EPO.

Plusieurs observations cliniques indiquent que l'hypoxémie est une complication de l'AVC et qu'elle est associée à un pronostic défavorable. Toutefois, les seuils critiques d'hypoxémie nécessitant traitement, ainsi que l'équilibre entre les effets bénéfiques et la toxicité de l'oxygénothérapie sont encore sujets à controverse. De fait, l'oxygénothérapie peut induire la formation de radicaux oxygénés dans la zone ischémique et aggraver le dommage cérébral (Sulter et al., 2000). L'étude de l'état homéostatique de l'oxygène dans des modèles animaux appropriés d'AVC devrait permettre de mieux caractériser l'hypoxémie post-AVC, pour être en mesure de mieux la traiter.

CHAPITRE 5

ÉRYTHROPOÏÉTINE ET ÉRYTHROPOÏÈSE APRÈS ISCHÉMIE CÉRÉBRALE AIGUË

5.1. Introduction

L'oxygène est nécessaire à tous les processus vitaux à l'échelle cellulaire (Bunn et Poyton, 1996; Hochachka et al., 1996). Parce que les globules rouges agissent comme des transporteurs d'oxygène dans le sang par l'entremise de la molécule d'hémoglobine, qui a une forte affinité pour l'oxygène, l'érythropoïèse doit être soumise à une régulation très stricte de manière à maintenir l'homéostasie et à s'adapter aux modifications de la demande et de l'apport en oxygène. De plus, l'hypoxie est une composante pathologique de nombreuses affections, y compris la crise cardiaque, l'AVC et le cancer, les principales causes de mortalité dans les sociétés occidentales (Iyer et al., 1998).

La production d'EPO par hypoxie fait intervenir le facteur induit par l'hypoxie-1 (décrit antérieurement) qui induit également l'expression de plusieurs enzymes glycolytiques, afin de réorienter le métabolisme énergétique et d'assurer la survie durant l'hypoxie (Semenza, 2000). La production accrue d'EPO dans le rein représente le principal mécanisme d'adaptation à l'hypoxie par l'organisme, par l'entremise d'une augmentation du nombre d'érythrocytes et, par le fait même, de l'oxygénation des tissus. L'érythropoïétine et son récepteur agissent comme les principaux médiateurs de la réaction physiologique à l'hypoxie. À l'instar d'autres membres de la superfamille des cytokines, l'EPO et son récepteur sont exprimés dans d'autres tissus, y compris le système nerveux. Comme c'est le cas pour sa régulation en périphérie, l'EPO est inductible par l'hypoxie dans le système nerveux central (Juul et al., 1998; Juul et al., 1999; Marti et al., 1996; Masuda et al., 1994).

5.2. Le récepteur de l'EPO

Le récepteur de l'EPO (EPOR) est exprimé sous la forme d'une protéine de 66 à 78 kD. Des expériences de complémentation de fragments protéiques et des études de cristallographie révèlent que le récepteur de l'EPO existe sous la forme d'un dimère préformé (Livnah et al., 1999; Remy et al., 1999). Une seule molécule d'EPO est capable

d'activer les récepteurs de l'EPO par dimérisation de deux homodimères (Philo et al., 1996). La fixation de l'EPO à son récepteur change la conformation de ce dernier, ce qui est nécessaire pour l'activation de JAK2 par un processus d'autodimérisation (Constantinescu et al., 2001; Kubaczky et al., 2001). Un site de liaison à haute affinité ($kD \sim 1 \text{ nM}$) et un autre site à faible affinité ($kD \sim 2 \text{ nM}$) ont été mis en évidence dans le domaine extracellulaire du récepteur (Mayeux et al., 1991; Philo et al., 1996; Qiu et al., 1998). La signalisation intracellulaire déclenchée par l'EPO fait intervenir une rapide phosphorylation des tyrosines de plusieurs protéines, même si le récepteur ne possède pas d'activité tyrosine kinase endogène. Les étapes de l'activation du récepteur par l'EPO sont décrites dans la figure 10. Comme on le voit, la signalisation intracellulaire repose sur l'activation de la tyrosine kinase JAK2, associée de manière constitutive au récepteur de l'EPO (Witthuhn et al., 1993) dans la région transmembranaire (Hilton et Berridge, 1995). L'activation de JAK2 mène à la phosphorylation de plusieurs voies de signalisation en aval, y compris la Ras-MAPK (Ras-mitogen Activated Protein Kinase), la phosphatidylinositol 3-kinase (PI₃K) et le facteur de transcription Stat5 (Fisher et al., 1996). Pour les érythroblastes, l'effet net de la stimulation du récepteur de l'EPO est l'inhibition de l'apoptose, la prolifération et la différenciation (Yoshimura et Misawa., 1998). On sait que le facteur des cellules souches (SCF) ou la protéine c-kit interagissent également avec le récepteur de l'EPO, entraînant un accroissement de la différenciation et de la prolifération des cellules de la lignée érythrocytaire (Wu et al., 1995a).

Une fois que le récepteur est activé par l'EPO, huit tyrosines du domaine cytoplasmique du récepteur sont phosphorylées (Miura et al., 1991; Yoshimura et Lodish., 1992). La figure 10 montre les sites d'amarrage de plusieurs protéines intracellulaires possédant des domaines SH2 (Src homology domain 2). La première étape de l'activation de son récepteur par l'EPO est une dimérisation (1); les kinases JAK2 associées au récepteur sont en contact étroit et sont activées par transphosphorylation (2); les tyrosines du récepteur de l'EPO sont ensuite phosphorylées (3, 4), ce qui fournit des sites d'amarrage pour des protéines de signalisation intracellulaire ayant des domaines SH2 (5). Outre sa fonction essentielle dans l'érythropoïèse, l'EPO pourrait influencer les fonctions de cellules n'appartenant pas à la lignée érythrocytaire, plus précisément, exercer des effets mitogènes et chimiotactiques sur les cellules endothéliales (Anagnostou et al., 1990) et les cellules du stroma hépatique foetal (Ohneda et al., 1993), deux types cellulaires ayant des récepteurs de l'EPO (Anagnostou et al., 1994; Ohneda et al., 1993).

La stimulation des cellules endothéliales par l'EPO accroît la phosphorylation des protéines et provoque la translocation nucléaire du facteur Stat5 (Haller et al., 1996). L'EPO peut également augmenter le calcium intracellulaire et la sécrétion d'endothéline -1 (Carlini et al., 1995). La présence du récepteur de l'EPO dans les cellules endothéliales pourrait résulter du lien étroit entre l'hématopoïèse et la vasculogénèse (Flamme et al., 1992) et entre l'hématopoïèse et l'angiogénèse (Asahara et al., 1997).

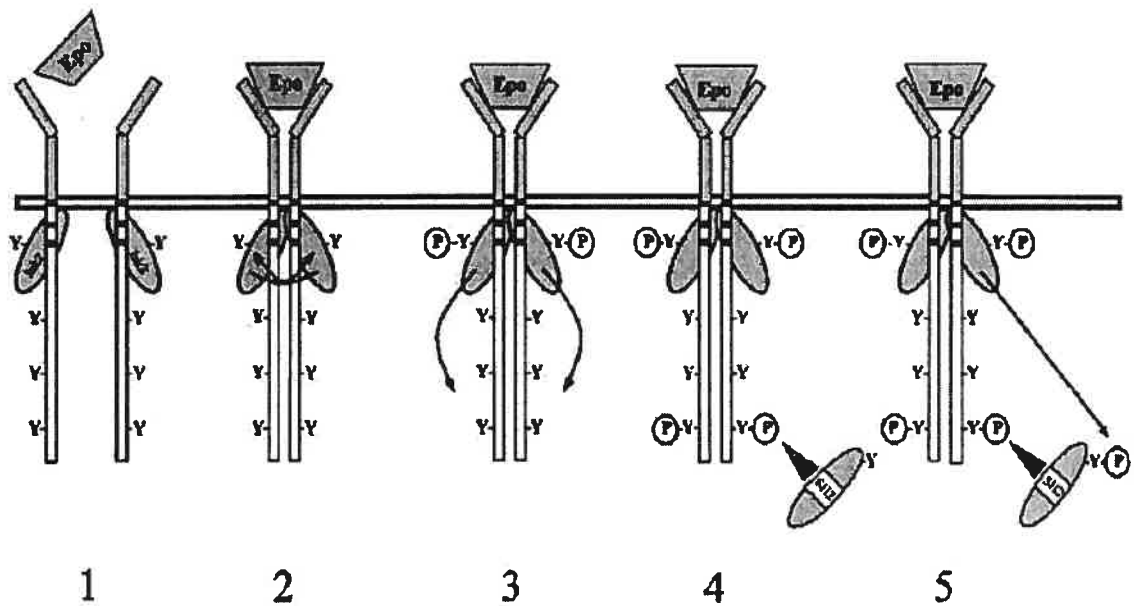


Figure 10. Activation du récepteur de l'EPO. (Tiré de Lacombe et Mayeux., 1999). (Voir le texte pour les étapes successives de l'activation).

La stimulation du récepteur de l'EPO dans le cerveau ne nécessite pas nécessairement que l'EPO traverse la barrière hémato-encéphalique, étant donné qu'une production d'EPO dépendante de l'oxygène a été observée dans des astrocytes en culture (Masuda et al., 1994) et que l'expression de l'EPO dans le cerveau adulte peut être stimulée par l'hypoxie chez la souris (Digicaylioglu et al., 1995) et le singe (Marti et al., 1996). L'EPO exerce des effets neurotrophiques sur des neurones embryonnaires en culture et favorise la survie de neurones lésés *in vivo* chez le rat (Konishi et al., 1993). En fait, l'EPO se fixe à des endroits précis du cerveau. La présence de l'EPO a été observée dans la capsule interne, le corps calleux, le corps bordant, la zona incerta, l'alvéus et le faisceau mamillothalamique et de plus dans des régions néocorticales telles les couches corticales

externes et dans l'hippocampe, une région de l'archéocortex. De plus, le marquage aidant à visualiser l'EPO a révélé une expression de l'EPO dans le tronc cérébral, le mésencéphale et les noyaux postéro-latéraux du thalamus : le noyau caudé-putamen, le pallidum et l'hypothalamus latéral (Digicaylioglu et al., 1995; Morishita et al., 1997; Morishita et al., 1996).

5.3. Sources de l'EPO

Le rein est le principal lieu de production de l'EPO (Erslev, 1974; Fisher et Birdwell., 1961; Jacobson et al., 2000; Kuratowska et al., 1961). Les cellules interstitielles pérítubulaires sont les cellules du rein qui produisent l'EPO (Koury et al., 1988; Fisher et al., 1996). Bien que le rein soit le principal lieu de production de l'EPO chez l'adulte, de nombreuses études indiquent qu'en réponse à un large éventail de stimuli, le foie possède également une importante capacité de synthèse de cette protéine (Beru et al., 1986; Erslev et al., 1980, Fried, 1972; Koury et al., 1991; Zanjavi et al., 1977). De plus, il a été rapporté que la réponse hépatique de rats soumis à une profonde hypoxie normobare ou à une exposition au monoxyde de carbone était substantielle, de 25 à 50 % de la totalité de l'ARNm de l'EPO étant produits par le foie (Eckardt et al., 1992; Tan et al., 1991).

L'examen de divers organes du rat a révélé que l'expression de l'ARNm de l'EPO était induite par l'hypoxie dans les testicules, le cerveau, le foie et les reins (Tan et al., 1992). Par la suite, on a montré que les astrocytes étaient responsables de la production d'EPO dans le cerveau (Marti et al., 1996; Masuda et al., 1994). Plus récemment, il a été démontré que les neurones produisaient eux aussi de l'EPO (Bernaudin et al., 1999). L'expression d'un récepteur de l'EPO fonctionnel a été observée dans des lignées cellulaires neuronales telles que PC12. Il a été établi que l'EPO augmentait les monoamines intracellulaires, la libération de dopamine et l'activité de la tyrosine hydroxylase (Koshimura et al., 1999; Masuda et al., 1993) et contribuait à la survie des cellules lorsque celles-ci étaient cultivées en l'absence de sérum et de facteur de croissance neuronal (Koshimura et al., 1999). L'EPO augmente le niveau de la choline acétyltransférase de neurones du septum d'embryon de souris en culture primaire (Konishi et al., 1993). Enfin, le récepteur de l'EPO est exprimé dans des cultures primaires de neurones préparées à partir de l'hippocampe et du cortex cérébral d'embryons de rats (Morishita et al., 1997).

L'ARNm du récepteur de l'EPO est abondamment exprimé dans le cerveau de jeunes embryons de souris, puis son niveau diminue considérablement au cours du

développement (Liu et al., 1997), ce qui pourrait indiquer que l'EPO joue un rôle encore obscur dans le développement du cerveau. Le SNC des primates, y compris des humains, exprime également l'EPO et son récepteur (Juul et al., 1998; Marti et al., 1996; Marti et al., 1997), ce qui indique qu'il est doté d'un système paracrine EPO/récepteur de l'EPO indépendant du système endocrine (rein/moelle osseuse et rate) pour l'érythropoïèse.

Ogilvie et ses collaborateurs (2000), ont rapporté l'expression du récepteur de l'EPO dans des cellules du muscle squelettique en culture primaire et dans la lignée de myoblastes C2C12, bien que l'expression du récepteur n'ait pas été décelée auparavant dans le muscle squelettique entier (Liu et al., 1994; Liu et al., 1997). Cette étude montre que l'action de l'EPO stimule la prolifération et diminue la différenciation et la fusion de ces cellules en myotubes. Enfin, la production d'EPO a été observée dans l'utérus et l'oviducte chez la souris, témoignant de la spécificité tissulaire des fonctions de l'EPO.

5.4. Régulation de l'EPO.

Malgré que l'expression de l'EPO soit spécifique de tissus, soumise à une régulation développementale et inductible, elle est régulée principalement au niveau transcriptionnel. Il n'existe pas de réserves intracellulaires de l'hormone. (Bunn et Poyton, 1996; Ratcliffe et al., 1997).

5.4.1. Rôle d'une protéine hémique

Selon le modèle proposé par Goldberg et ses collaborateurs en 1988, la détection de l'oxygène ferait intervenir une protéine hémique pouvant fixer de manière réversible l'oxygène, de telle sorte qu'elle entraîne l'expression du gène de l'EPO dans sa forme désoxygénée, mais non dans sa forme oxygénée. Ainsi, l'ajout de cobalt au noyau de l'hème du détecteur présumé entraîne une perte de la fixation de l'oxygène. Par ailleurs, le monoxyde de carbone (CO), qui inhibe l'expression d'EPO induite par l'hypoxie, se lierait au détecteur afin de stabiliser la conformation oxygénée. Il a été démontré que le chlorure de cobalt (anion divalent) et la déferoxamine (chélateur du fer) stimulaient l'expression de l'ARNm de l'EPO, la liaison à l'ADN du facteur HIF-1 et l'expression de gènes rapporteurs contenant l'élément HRE (hypoxia response element) du gène de l'EPO (Semenza et al., 1991; Wang et Semenza., 1993c). Le cobalt et la déferoxamine stimulent à la fois l'expression de la sous-unité HIF-1 α et sa transactivation (Juang et al., 1997). Cependant, d'autres chercheurs ont suggéré que ces deux substances n'agissaient pas par

les mêmes mécanismes que l'hypoxie (Chandel et al., 1998; Fandrey et al., 1997; Maxwell et al., 1999). De plus, on a rapporté récemment que le CO et le monoxyde d'azote (NO) inhibaient directement le HIF-1 (Liu et al., 1998; Sogawa et al., 1998). D'autres chercheurs ont montré qu'un inhibiteur de la NADPH oxydoréductase bloquait l'induction de l'ARNm de l'EPO et la fixation à l'ADN du facteur HIF-1 dans les cellules exposées à l'hypoxie (Gleadle et al., 1995), ce qui est à l'opposé du modèle proposé dans le cas des IRO.

5.4.2. Rôle de l'adénosine

On a également rapporté que la kinase A, mais non la kinase C, intervenait dans l'activation du HIF-1 α et l'induction de l'ARNm de l'EPO (Kvietikova et al., 1995). Les auteurs de cette étude ont observé que les facteurs de transcription ATF-1 et CREB-1 se liaient de manière constitutive au site de reconnaissance du HIF-1 sur l'ADN. On a émis l'hypothèse que l'adénosine était le principal facteur de régulation de la production d'EPO, agissant surtout par l'intermédiaire des protéines kinases A et C et de la phospholipase A2. La première étude suggérant que l'adénosine pouvait intervenir dans la production d'EPO a été rapportée par Ueno et ses collaborateurs (Ueno et al., 1988), dans un article révélant que la théophylline, un antagoniste non sélectif des récepteurs A1 et A2 de l'adénosine, inhibait la production d'EPO induite par l'hypoxie chez la souris. Le modèle qui décrit la participation de l'adénosine dans les voies de transduction de signal intervenant dans la régulation de la production d'EPO est présenté ci-après (figure 11). L'hypoxie entraînerait une hausse des concentrations d'adénosine dans le liquide extracellulaire (Mentzer et al., 1975) en augmentant l'activité ectonucléotidase (Minamino et al., 1995), qui découle de la dégradation accrue d'ATP; d'autre part, l'ARNm du récepteur A2 de l'adénosine ainsi que le récepteur A2 lui-même augmentent dans les cellules PC12 incubées sous atmosphère hypoxique (Kobayashi et Millhorn, 1999). En outre, le recours à différents antagonistes des récepteurs de l'adénosine permet d'inhiber les effets de l'hypoxie sur la production d'EPO chez la souris (Ueno et al., 1988) et dans des cultures de cellules Hep3B.

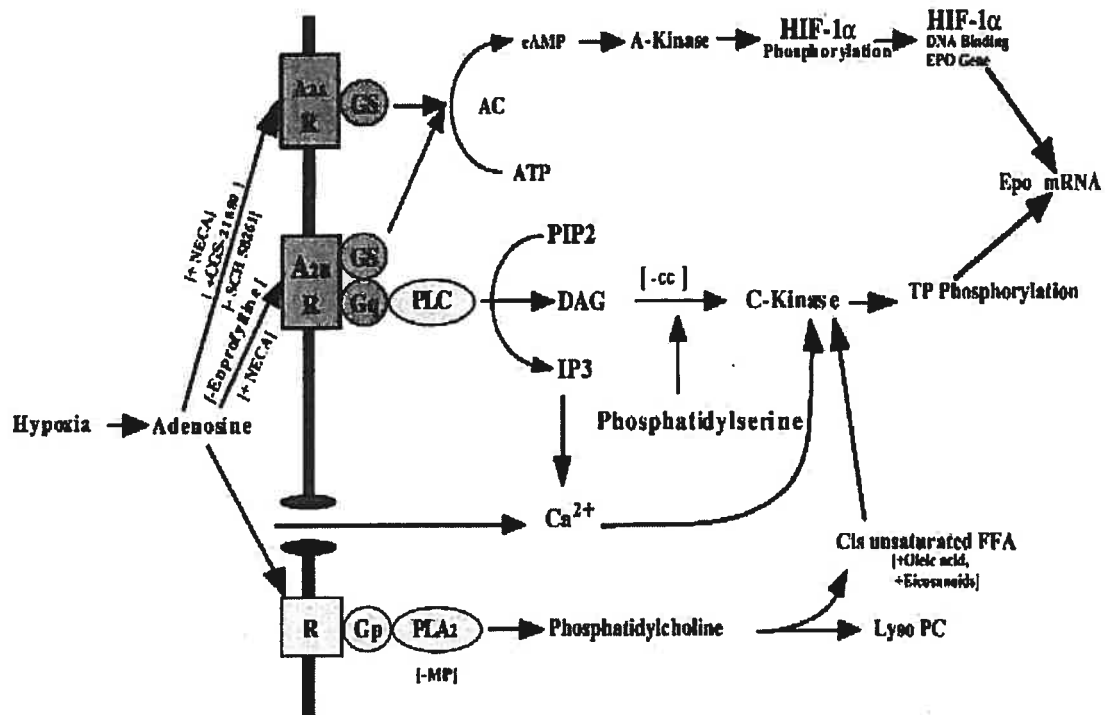


Figure 11. Modèle intégrant les protéines kinases A et C et la phospholipase A2 dans la régulation hypoxique de la production d'EPO (Fisher et Brookins, 2001)

5.4.3. Voies de signalisation additionnelles impliquées dans l'expression de l'EPO

En ce qui concerne le rôle des MAPK dans la production de l'EPO, trois familles ont été décrites : les kinases régulées par un signal extracellulaire (ERK), les c-Jun N-terminal kinases (JNK) et les MAPK p38. Chaque type de MAPK est reconnu et activé par des MAPK kinases spécifiques, qui elles-mêmes sont phosphorylées par plusieurs ensembles différents de MAPK kinase kinases se recouvrant partiellement. Les MAPK font l'objet d'une translocation vers le noyau, où elles peuvent phosphoryler des facteurs de transcription associés à l'expression de gènes précis. Richard et ses collaborateurs (1999), ont montré que les MAPK p42/p44 (ERK) pouvaient phosphoryler le HIF-1 α et stimuler l'activité transcriptionnelle du HIF-1, bien que l'hypoxie n'active pas ces MAPK. Récemment, la MAPK p38 a été mise en cause dans la stabilisation de l'ARNm de l'EPO chez des souris où p38 est peu exprimée, ainsi que dans les cellules Hep3B (Tamura et al., 2000). L'activation des JNK n'a pas été reliée à l'expression de l'EPO.

Des études récentes ont mis en cause la voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI₃K)/AKT (protéine kinase B) dans l'activation du HIF-1 (Jiang et al., 2000; Mazure et al., 1997; Wang et al., 1999; Zhong et al., 2000). Les produits lipidiques provenant de la catalyse par le PI₃K sont des activateurs allostériques de la kinase-1 dépendante du phosphatidylinositol, qui phosphoryle et active l'AKT. Les cibles de l'AKT comprennent le facteur nucléaire κ B (NF- κ B), un facteur de transcription (Burow et al., 2000a; Burow et al., 2000b). Les gènes de diverses cytokines requièrent l'activation du facteur NF- κ B (Allen et Tresini, 2000; Bowie et O'Neill., 2000; Piette et al., 1997), que l'on sait nécessaire pour la réponse d'une cellule à divers signaux de stress, y compris les agents mutagènes, les oxydants et l'hypoxie (D'Angio et al., 2000). Dans des cellules non stimulées, le NF- κ B se trouve dans le cytoplasme, fixé à une protéine inhibitrice (I κ B) qui empêche sa translocation dans le noyau. Une fois activée en réponse à différents signaux, la protéine I κ B est phosphorylée, ce qui entraîne son ubiquitination et en fait une cible de dégradation protéosomale. De nombreux agents activant le NF- κ B stimulent également les MAPK, ce qui suggère qu'il existe une interaction entre ces deux voies. Dans certains cas, la MAPK p38 est nécessaire à l'activation du NF- κ B (Jiang et al., 1997), mais pas toujours (Taher et al., 2000). L'activation coordonnée de multiples voies MAPK pourrait permettre la transduction de signaux ayant des effets positifs et négatifs sur l'activation du NF- κ B. Dans une étude sur les cellules Hep3B, Figueroa et ses collaborateurs (2002), ont mentionné que le NF- κ B jouait un rôle clé dans la régulation de l'expression génétique de l'EPO par l'hypoxie et ont proposé un modèle (figure 12). On ignore pour l'instant si le NF- κ B est une voie spécifique de l'EPO ou si le NF- κ B est également cruciale pour d'autres gènes régulés par l'hypoxie. Il est possible que l'hypoxie ne soit pas le seul facteur important dans la régulation et la production de l'EPO dans le cerveau et d'autres organes. Les troubles métaboliques, y compris l'hypoglycémie et une forte dépolarisation neuronale, génèrent des ROS mitochondriales pouvant accroître l'expression de l'EPO par l'entremise du HIF-1 (Chandel et al., 1998). Par conséquent, l'EPO pourrait protéger le tissu nerveux dans toute situation caractérisée par un déficit relatif d'ATP en présence de besoins métaboliques accrus (Prière voir plus loin, section 5.6).

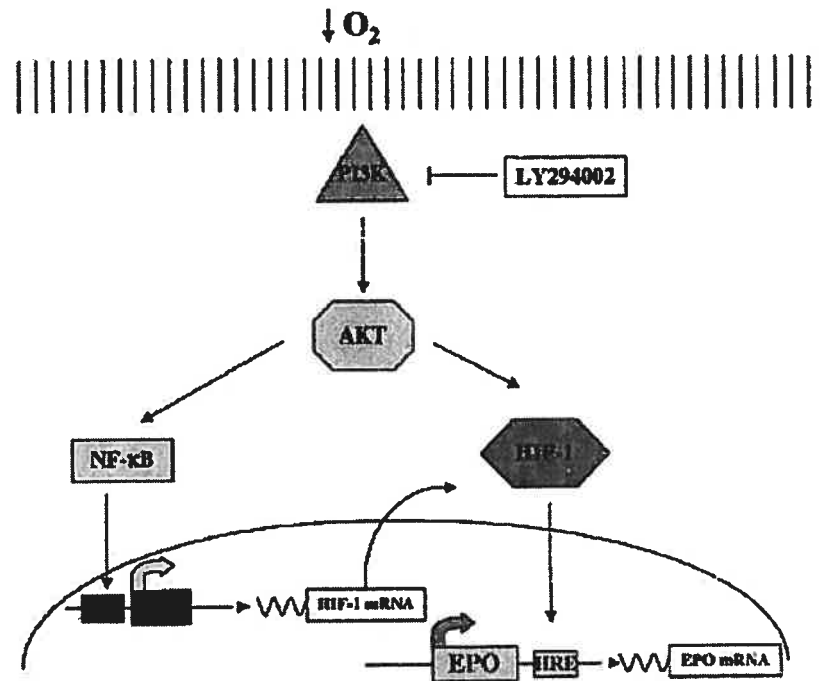


Figure 12. Rôle de la PI₃K/AKT dans l'expression de l'EPO (Figuerola et al., 2002)

5.4.4. Cinétique de l'expression de l'EPO dans différents organes

Une étude récente réalisée par Chikuma et ses collaborateurs (2000) a montré que des souris non ovariectomisées exposées à une atmosphère pauvre en O₂ (7 %) présentaient une élévation marquée de l'EPO sérique et de l'ARNm de l'EPO dans le rein et les hémisphères cérébraux. Les taux d'EPO dans le sérum et d'ARNm de l'EPO dans le rein ont toutefois rapidement décliné en dépit d'une hypoxie continue (Chikuma et al., 2000).

Fait étonnant, l'ARNm de l'EPO s'est maintenu à une concentration élevée pendant au moins 24 heures dans le cerveau. Dans des conditions de normoxie, le taux d'ARNm de l'EPO n'a pas été affecté par l'administration d'œstrogènes. Sous hypoxie, les œstrogènes ont légèrement augmenté le taux d'ARNm de l'EPO, mais pas significativement (Chimuka et al., 2000).

Des cinétiques semblables ont été observées chez les souris mâles. Les valeurs d'hématocrite sont demeurées inchangées dans toutes les conditions utilisées, ce qui indique que la réduction de l'ARNm de l'EPO dans le rein et de l'EPO dans le sérum, découlant d'une exposition prolongée faible en oxygène n'est pas due à une boucle de rétroaction négative classique, mais que la formation accrue d'érythrocytes réprime

l'expression du gène de l'EPO, par l'entremise d'un meilleur acheminement de l'oxygène (Sasaki et al., 2001).

Bien que le mécanisme de la baisse rapide l'ARNm de l'EPO dans le rein soit inconnu, cette différence notable entre le rein et le cerveau dans la cinétique de l'induction de l'ARNm de l'EPO par l'hypoxie semble bien refléter la spécificité tissulaire des fonctions de l'EPO. Dans le cerveau, l'EPO favorise la survie des neurones en présence d'hypoxie et, par conséquent, un degré élevé d'expression de l'EPO est nécessaire tant que dure l'hypoxie, tandis que l'activation continue de l'expression du gène de l'EPO dans le rein provoquerait une surproduction d'érythrocytes, causant différents troubles pathologiques (Chikuma et al., 2000). Par conséquent, la régulation négative de l'expression du gène de l'EPO peut fonctionner, même dans des conditions d'hypoxie dans le rein, mais non dans le cerveau.

Dans le cervelet, l'ARNm de l'EPO est également inductible par l'hypoxie, avec des cinétiques semblables à celles des hémisphères cérébraux, mais son rôle à cet endroit n'est pas connu (Sasaki et al., 2000). De plus, une étude menée par Springborg et ses collaborateurs (2003) chez des sujets ayant une hémorragie sous-arachnoïdienne d'origine anévrysmale révèle que le cerveau produit de l'EPO. Des échantillons de sérum et de liquide céphalorachidien (LCR) ont été recueillis chez 18 sujets. Chez la plupart des patients, la concentration moyenne d'EPO dans le LCR était d'environ 0,93 mU/mL. Seulement la moitié des patients présentaient une concentration d'EPO supérieure à 1 mU/mL dans le LCR. La concentration d'EPO dans le LCR n'était pas en corrélation avec la concentration dans le sérum et ne dépendait pas de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, ce qui porte à croire que l'EPO du cerveau n'avait pas une origine sanguine, mais avait plutôt été synthétisée par le SNC.

En général, la synthèse de l'EPO est stimulée à la fois par l'hypoxie hypoxique et l'hypoxie anémique. L'induction causée par la baisse de la PaO_2 est transitoire; elle atteint son maximum après 18 heures d'hypoxie chez les rongeurs, et après 48 heures chez les humains, après quoi elle décline. L'induction découlant de l'anémie est de longue durée et beaucoup plus importante que l'induction causée par une baisse de la PaO_2 (Czyzyk-Krzeska et al., 1997). Eckhart et ses collaborateurs (1993) ont constaté que chez le rat sous hypoxie profonde, l'ARNm de l'EPO rénale et l'EPO sérique augmentaient en parallèle après environ quatre heures, atteignaient un maximum après huit heures, puis déclinaient jusqu'à 32 heures, ce qui semble confirmer les observations de Chikuma et ses

collaborateurs (2000). La baisse de la production d'EPO a lieu malgré le fait que l'hypoxie se poursuive et il y a une relation exponentielle inverse entre la tension en oxygène et la réponse de l'EPO. Fried et ses collaborateurs (1970), ont signalé que chez le rat, les concentrations plasmatiques d'EPO atteignaient leur maximum après huit heures d'une hypoxie prolongée puis déclinaient jusqu'à devenir à peine décelables après 72 heures.

5.5. L'EPO dans l'inflammation

Les processus inflammatoires jouent un rôle-clé dans de nombreuses formes de lésion cérébrale. Dans le SNC, les réactions inflammatoires sont déclenchées par des causes très diverses et peuvent donner des résultats bénéfiques ou nuisibles. Par exemple, les lésions touchant le cerveau ou la moelle épinière sont caractérisées par un centre nécrosé, entouré d'une région de taille variable contenant des cellules lésées (pénombre), à risque de dégénérescence durant les heures ou les jours qui suivent. Non maîtrisées, les réactions inflammatoires auto-entretenues à l'intérieur de la pénombre accroissent considérablement la taille de l'infarctus. Récemment, les chercheurs se sont intéressés au rôle des mécanismes de protection locaux réduisant le volume de la pénombre. L'EPO et son récepteur constituent un mécanisme neuroprotecteur endogène prometteur.

On ne peut exclure un effet anti-inflammatoire direct de l'EPO par l'intermédiaire du réseau de cytokines, parce que l'EPO diminue la production *ex vivo* du TNF- α et augmente la production de l'IL-10 dans des cultures de cellules sanguines provenant de patients sous hémodialyse (Bryl et al., 1998). L'EPO pourrait réduire l'hyperexcitabilité associée à la reperfusion parce qu'elle semble avoir un effet direct sur l'excitabilité neuronale (Brines et al., 2000).

Récemment Brines et ses collaborateurs (2000), Sirén et ses collaborateurs (2001a), et Agnello et ses collaborateurs (2002), ont rapporté que l'EPO administrée par voie systémique traversait la barrière hémato-encéphalique pour assurer une protection contre l'ischémie cérébrale transitoire (occlusion de l'ACM), les lésions cérébrales traumatiques et les effets toxiques de l'acide kaïnique, chez la souris et le rat, et contre l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) chez le rat Lewis. Chez des rats ayant subi une ischémie cérébrale transitoire, Agnello et collaborateurs (2002) ont observé que l'EPO diminuait l'infiltrat inflammatoire et la production de cytokines inflammatoires. L'EPO a un effet anti-apoptotique sur les neurones (Sirén et al., 2001b) et l'inhibition de l'apoptose des précurseurs de la lignée érythrocytaire est un des mécanismes sous-tendant son effet sur

l'érythropoïèse (Yoshimura et Misawa, 1998). En outre, il ne peut être exclu que dans l'EAE, l'effet protecteur de l'EPO soit associé à son activité érythropoïétique. Dans ce modèle, l'EPO a été administrée quotidiennement pendant plusieurs jours et une augmentation de l'hématocrite d'environ 30 % fut observée après une semaine. Le mécanisme par lequel ce traitement combat la maladie n'est pas élucidé. Il est possible que les érythrocytes, ayant de très fortes quantités d'enzymes anti-oxydantes et étant perméables au peroxyde d'hydrogène, puissent protéger les autres cellules des lésions oxydatives (Lo et Agar, 1986; Brown et al., 1989), un type de lésions en cause dans plusieurs processus inflammatoires et dans l'EAE (Van Dam et al., 1995). L'EPO humaine recombinante (EPOhr) pourrait exercer son effet anti-inflammatoire en empêchant la production de signaux moléculaires par les neurones lésés, p. ex., l'apparition de phosphatidylsérine à l'intérieur de la membrane cellulaire, un signal crucial pour le recrutement et l'activation de cellules microgliales et d'astrocytes (Henson et al., 2001; Savill et al., 1993). D'autres études seront nécessaires pour évaluer cette possibilité.

5.6. L'EPO dans l'ischémie cérébrale

L'expression du gène de l'EPO dans le cerveau est régulée par le HIF-1, qui est activé par différents facteurs de stress, dont l'hypoxie. Plusieurs groupes indépendants de recherche ont rapporté que l'EPO protégeait des neurones en culture des effets toxiques du glutamate (Bernaudin et al., 1999; Morishita et al., 1997) et réduisait les lésions neuronales ischémiques et le dysfonctionnement des neurones dans des modèles d'AVC chez les rongeurs (Bernaudin et al., 1999; Brines et al., 2000; Sadamoto et al., 1998; Sakanaka et al., 1998). L'administration d'EPO par voie générale a un effet neuroprotecteur, non seulement chez les modèles animaux d'ischémie cérébrale, mais également à l'égard des traumatismes mécaniques, des excitotoxines et de la neuro-inflammation (Brines et al., 2000).

Sirén et ses collaborateurs (2001b) ont montré que les différentes voies de signalisation caractérisées dans des lignées de cellules hématopoïétiques (Ihle, 1995) sont fonctionnelles dans les neurones et peuvent être modulées par l'EPO. La neuroprotection conférée par l'EPO semble faire intervenir principalement les voies de signalisation anti-apoptotiques, dont le rôle est bien établi dans la médiation des effets de l'EPO dans l'hématopoïèse (Lawson et al., 2000; Socolovsky et al., 1999). L'administration d'EPO par voie systémique (5000 unités/kg de poids corporel, par voie i.-p.) après l'occlusion de l'ACM chez le rat provoque une baisse considérable de la taille de l'infarctus 24 heures

plus tard, ainsi qu'une réduction du marquage au dUTP de cassures dans l'ADN, par la désoxynucléotidyl terminal transférase dans les neurones de la pénombre ischémique. Dans des cultures neuronales pures ou mixtes, l'EPO (0,1–10 unités/mL) inhibe également l'apoptose provoquée par une privation de sérum ou par une exposition à l'acide kaïnique.

Des changements marqués de l'expression génétique de l'EPO et de son récepteur ont par la suite été notés dans le tissu cérébral après une lésion ischémique (Bernaudin et al., 1999; Sadamoto et al., 1998). Toutefois, la protection fournie par l'EPO endogène est manifestement insuffisante en cas de lésion aiguë, contrairement à l'effet neuroprotecteur important que l'on obtient lors de l'administration d'EPO exogène *in vivo* (Brines et al., 2000). Il est possible que le cerveau ne produise pas suffisamment d'EPO après une ischémie cérébrale ou que la période de latence de la néosynthèse soit trop longue pour pouvoir protéger le tissu nerveux. En fait, il se peut que la composante inflammatoire de l'ischémie limite la production d'EPO, car le facteur de nécrose tumorale, dont la production dans le cerveau ischémique a été démontrée (Meistrell et al., 1997), inhibe directement la production d'EPO *in vivo*. L'EPO prévient l'apoptose neuronale déclenchée par la privation d'oxygène, par les substances nutritives et les facteurs de croissance ou par l'exposition à l'acide kaïnique (Sirén et al., 2001). En plus d'exercer des effets autocrines/paracrines locaux, l'EPO est également une hormone circulante. Par conséquent, il est possible qu'il existe une interaction entre les deux systèmes, général et local (Sirén et al., 2001).

Les astrocytes constituent la principale source cellulaire d'EPO dans le cerveau et une faible tension en oxygène stimule l'expression de l'ARNm de l'EPO dans les astrocytes (Sakanaka et al., 1998). Le récepteur de l'EPO, tel que mentionné plus haut, a été décelé dans les neurones ainsi que dans les astrocytes (Bernaudin et al., 2000; Digicaylioglu et al., 1995; Ledbetter et Juul., 2000; Liu et al., 1997; Marti et al., 1996; Masuda et al., 1993). Cela pourrait avoir des conséquences pour le préconditionnement ischémique, étant donné que l'EPO est dotée de puissantes propriétés neuroprotectrices *in vivo* et *in vitro* (Bernaudin et al., 1999; Brines et al., 2000; Calapai et al., 2000; Konishi et al., 1993; Morishita et al., 1997; Sadamoto et al., 1998; Sakanaka et al., 1998; Sinor et Greenberg, 2000; Sirén et al., 2001).

5.6.1. Neuroprotection par l'EPO *in vitro*

Le glutamate est l'un des principaux acides aminés neurotransmetteurs dans le SNC des mammifères et il agit également comme médiateur des lésions neuronales (Sasaki et al., 2000). L'activation du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA), un récepteur du glutamate exprimé dans les neurones, ouvre un canal perméable aux ions Na^+ et Ca^{2+} . On pense que l'activation prolongée du récepteur NMDA, due à une récupération insuffisante du glutamate libéré comme neurotransmetteur, serait responsable de la mort neuronale provoquée par l'ischémie. L'entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule qui suit l'activation du récepteur NMDA entraîne la mort neuronale. L'EPO protège les neurones d'hippocampe et de cortex cérébral en culture primaire des effets toxiques du glutamate (Bernaudin et al., 1999; Morishita et al., 1997). La hausse intracellulaire de Ca^{2+} causée par le glutamate stimule la NO synthase neuronale, laquelle requiert le complexe Ca^{2+} -calmoduline, ce qui cause une augmentation du NO rapidement converti en composés hautement toxique tel que le peroxy-nitrite. L'ajout d'EPO aux neurones en culture a permis d'éviter la mort neuronale due au nitroprussiate, un producteur de NO (Sakanaka et al., 1998). Par conséquent, l'EPO peut prévenir la mort neuronale en atténuant la toxicité des composés dérivés du NO. L'EPO favorise la survie des précurseurs de la lignée érythrocytaire en stimulant l'expression de Bcl-x, un membre de la famille Bcl-2 qui agit comme une protéine anti-apoptotique. Le mécanisme par lequel l'EPO favorise la survie neuronale n'est pas connu.

5.6.2. Neuroprotection par l'EPO *in vivo*

Dans un modèle d'ischémie du cerveau antérieur chez la gerbille, une perfusion intracérébroventriculaire d'EPO atténue la perte de synapses provoquée par l'ischémie dans le champ CA1 de l'hippocampe, qui contient des neurones très vulnérables aux lésions ischémiques, et en bout de ligne, diminue la mort neuronale et les troubles d'apprentissage (Sakanaka et al., 1998). L'utilisation d'une forme soluble du récepteur de l'EPO, un domaine extracellulaire capable de se lier à l'EPO, a fourni des indications que l'EPO endogène du cerveau est essentielle à la survie des neurones. La perfusion de récepteur soluble de l'EPO a provoqué l'apparition de neurones contenant de l'ADN fragmenté (révélés par la méthode TUNEL) dans le cerveau soumis à une ischémie légère, n'entraînant pas de lésions cérébrales décelables. Ce traitement est responsable de la mort neuronale et de troubles d'apprentissage, tandis que la perfusion d'une forme dénaturée par

la chaleur du récepteur soluble de l'EPO n'a pas eu d'effet nuisible (Sakanaka et al., 1998). La perfusion d'EPO dans les ventricules cérébraux atténue l'incapacité au test de navigation spatiale ainsi que l'infarctus cortical provoqués par l'occlusion permanente de l'ACM (Bernaudin et al., 1999; Sadamoto et al., 1998). L'EPO a également des effets neurotrophiques (Konishi et al., 1993; Tabira et al., 1995) et protège les neurones des effets toxiques du glutamate lors de l'ischémie cérébrale globale (Sakanaka et al., 1998) et focale (Sadamoto et al., 1998).

5.6.3. Rôle de l'EPO dans la tolérance ischémique

L'EPO semble impliquée dans les mécanismes moléculaires de tolérance ischémique induite par l'hypoxie, comme l'indiquent des expériences *in vitro* et *in vivo*. En effet, dans un modèle d'ischémie cérébrale *in vitro* utilisant des neurones corticaux de rat privés d'oxygène et de glucose, Ruscher et ses collaborateurs (2002) ont réalisé les observations suivantes : 1) les astrocytes ainsi que les neurones peuvent produire des signaux paracrines qui entraînent une protection contre l'hypoxie/ischémie dans les neurones; 2) un médiateur clé de la neuroprotection paracrine conférée par les astrocytes (mais non les neurones) est l'EPO qui agit par l'intermédiaire de son récepteur; 3) la neuroprotection conférée par l'EPO est obtenue en quelques minutes et peut durer plusieurs heures si l'exposition à l'EPO se poursuit; 4) dans les neurones, l'EPO entraîne une neuroprotection par l'entremise d'une série de phosphorylations de protéines, dont JAK2 et PI₃K/Akt, pouvant mener à l'inactivation de Bad, un membre de la famille des protéines pro-apoptotiques Bcl-2; 5) les autres voies de signalisation bien caractérisées de l'EPO (Stat, ERK) ne semblent pas jouer un rôle important dans ce système. La même équipe a montré que l'ARNm de l'EPO est augmenté dans le tissu cérébral chez les souris soumises à un préconditionnement hypoxique (8% O₂ et 92% N₂) et que l'administration du récepteur soluble de l'EPO diminue l'effet protecteur du préconditionnement (Prass et al., 2003b).

En plus d'exercer des effets autocrines/paracrines locaux, l'EPO est également une hormone circulante. Par conséquent, il est possible qu'il existe une interaction entre les deux systèmes, général et local (Sirén et al., 2001). Brines et ses collaborateurs (2000) ont fourni des preuves qu'une interaction était possible entre l'EPO périphérique et l'EPO centrale. Ces auteurs ont proposé que le passage de l'EPO périphérique à travers la barrière

hémato-encéphalique pouvait se produire par transcytose faisant appel au récepteur de l'EPO abondamment exprimé dans les capillaires du cerveau (Brines et al., 2000).

5.7. L'EPO dans le traitement de l'AVC

L'un des plus importants progrès réalisés dans le domaine de la recherche s'est produit lorsque Miyake et ses collaborateurs (Miyake et al., 1977) ont rapporté la purification jusqu'à homogénéité de l'EPO humaine. Cela a permis à Lin et ses collègues (Lin et al., 1985), et à Jacobs et ses collègues (1985), de cloner le gène de l'EPO et de produire, à partir de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO), une lignée de cellules transfectées produisant de l'EPO recombinante utilisée dans le traitement des anémies cliniques. L'EPOhr a été administrée à beaucoup de sujets au cours de la dernière décennie, dont un bon nombre souffraient de maladies graves, à titre de traitement sûr et très efficace de l'anémie.

Compte tenu de ces données pré-cliniques et cliniques, l'EPOhr, constitue une candidate intéressante à évaluer comme traitement de l'AVC chez l'humain. Ehrenreich et ses collaborateurs (2002) ont étudié l'effet de l'administration de l'EPOhr chez des sujets ayant un AVC sur une période de suivi de 30 jours. Dans les deux études, les patients ont reçu de l'EPOhr par voie intraveineuse ($3,3 \times 10^4$ UI/50 mL/30 min), une fois par jour, les trois premiers jours suivant un AVC. Après l'examen d'un nombre limité de patients, qui consistait à la première étude pour l'évaluation de la tolérabilité et de la sécurité de l'EPO, ils ont constaté que l'EPOhr administrée à forte dose par voie intraveineuse à des sujets ayant subi un AVC aigu dans le territoire de l'ACM, était sûre et bien tolérée. Par la suite, dans une étude à double insue (deuxième étude), dans laquelle 40 patients ont reçu de l'EPOhr ou une solution saline par voie intraveineuse, dans les huit heures suivant l'apparition des symptômes d'ischémie, les mêmes chercheurs ont observé une nette amélioration de la fonction neurologique et une atténuation de l'incapacité liée à l'AVC lors d'une évaluation réalisée 30 jours après le traitement.

En résumé, aucun problème lié à l'innocuité de l'administration de l'EPOhr n'a été mis en évidence. La concentration d'EPO dans le LCR était de 60–100 fois plus élevée que chez les patients traités avec du salin, ce qui montre que l'EPOhr administrée par voie intraveineuse atteint le cerveau. Dans l'essai portant sur l'efficacité, les patients ont reçu de l'EPOhr dans les cinq heures suivant l'apparition des symptômes (médiane; écart : 2 h 40–7 h 55). Une forte tendance à une réduction de la taille de l'infarctus a également été

observée par fMRI chez les patients traités par l'EPOhr, comparativement aux témoins. Un essai clinique de plus grande envergure serait donc justifié puisque cette étude n'a inclus que 40 patients dans la phase à double insue et que le suivi des patients s'est effectué 30 jours suivant le traitement. Habituellement, un suivi de 90 jours est considéré comme standard pour l'évaluation des paramètres neurologiques et fonctionnels (Weir et al., 2004).

Une limitation possible à l'utilisation de l'EPO dans le traitement de l'ischémie cérébrale pourrait être due au fait que l'EPO cause, dans la circulation sanguine, une augmentation de l'hématocrite et par conséquent, de la viscosité du sang. Cet accroissement de la viscosité pourrait avoir des effets défavorables dans l'ischémie cérébrale. Les chercheurs ont constaté dans leur étude que le nombre de réticulocytes avait augmenté dans le groupe de patients traités par l'EPOhr (statistique non fournie par l'auteur), mais aucune différence significative quant à l'hématocrite n'a été observée entre les groupes durant la période de suivi de 30 jours (Ehrenreich et al., 2002).

5.8. L'EPO dans l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est le processus par lequel une fraction des cellules souches hématopoïétiques primitives et pluripotentes se différencient successivement en précurseurs BFU-E (*burst-forming units-erythroid*), en précurseurs CFU-E (*colony-forming units-erythroid*), en normoblastes, en érythroblastes, en réticulocytes et enfin, en érythrocytes matures.

L'EPO est nécessaire au développement et à la maturation des cellules de la lignée érythrocytaire et agit en stimulant la prolifération et la différenciation des précurseurs de cette lignée. Des souris n'exprimant pas l'EPO ou son récepteur meurent *in utero* en raison d'une érythropoïèse foetale insuffisante dans le foie (Wu et al., 1995a). La production d'EPO peut être induite par l'hypoxie et assurer la régulation physiologique de la masse érythrocytaire. À l'instar d'autres membres de la famille des cytokines ayant une action sur l'érythropoïèse tels que la thrombopoïétine, l'interleukine-3 (IL-3), le facteur de stimulation des granulocytes et des macrophages (GM-CSF) et la prolactine, JAK2 est nécessaire à la signalisation (Neubauer et al., 1998; Parganas et al., 1998) et sa phosphorylation active le facteur Stat5 (Quelle et al., 1996, Sawyer et Penta, 1996) et d'autres voies de transduction de signal.

Le calcium a été mis en cause dans l'activité de l'EPO. Ainsi, dans les précurseurs de la lignée érythrocytaire, l'EPO entraîne une augmentation dépendante de la

concentration du calcium intracellulaire, par l'intermédiaire de la phosphorylation d'une tyrosine du récepteur de l'EPO, plus précisément de la tyrosine cytoplasmique en position 460 (Miller et al., 1999). La capacité de la prolactine, de concert avec le récepteur de la prolactine exprimé à l'aide d'un vecteur rétroviral, de permettre les stades tardifs de l'érythropoïèse (Socolovsky et al., 1999), laisse penser que la fonction principale de l'EPO, mise à part sa capacité à induire la différenciation de la lignée érythrocytaire, est son activité comme facteur de viabilité (Gregory et al., 1999; Muta et al., 1994) et de prolifération (Socolovsky et al., 1997). Chez l'adulte, l'érythropoïèse nécessite l'action de l'IL-3 et de l'EPO sur leurs récepteurs respectifs.

5.8.1. Facteurs intervenant dans la régulation de l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est régulée par plusieurs cytokines. Le processus d'érythropoïèse, allant de la cellule souche pluripotente primitive à l'érythrocyte mature et les étapes de cette maturation, où des facteurs de régulation interviennent pour stimuler l'engagement et la maturation des cellules de la lignée érythrocytaire, sont illustrés dans la figure 13. Les facteurs de croissance participant à l'érythropoïèse sont le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF), l'IL-6, le facteur des cellules souches (SCF), l'IL-1, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-9, l'IL-11, le facteur de stimulation des granulocytes et des macrophages (GM-CSF), le facteur de croissance semblable à l'insuline-1 (IGF-1) et l'EPO. L'EPO agit aux stades plus tardifs du développement des précurseurs de la lignée érythrocytaire. Elle agit principalement sur les CFU-E de la moelle osseuse et les amène à proliférer et à poursuivre leur maturation, en devenant des normoblastes, puis des réticulocytes et des érythrocytes matures (Gregory et Eaves, 1977; Gregory et Eaves, 1978). L'EPO agit en synergie avec le SCF, le GM-CSF, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-9 et l'IGF-1 pour entraîner la prolifération et la maturation des précurseurs BFU-E et CFU-E en normoblastes durant le développement des cellules érythrocytaires (Lin et al., 1996; Wu et al., 1995b). L'EPO agit principalement sur l'apoptose de manière à diminuer le taux de mort cellulaire chez les précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse (Lin et al., 1996).

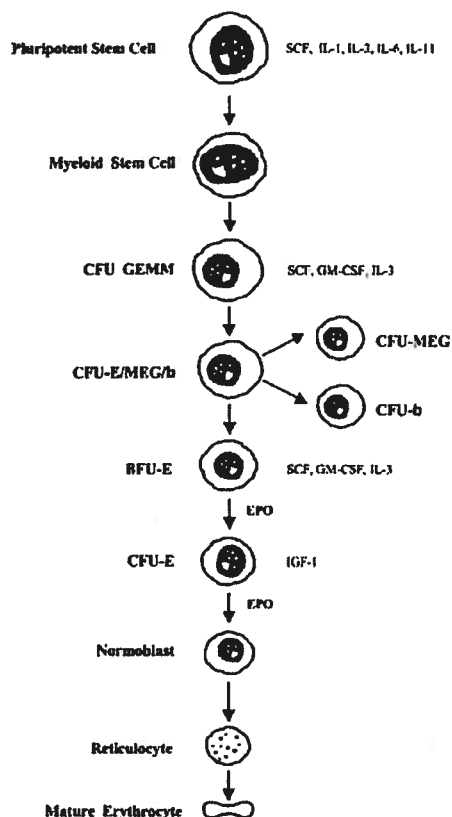


Figure 13. Les facteurs de croissance ayant une influence sur l'érythropoïèse, de la cellule souche pluripotente à l'érythrocyte mature. (Sieff et Nathan, 1996)

Le SCF, l'IL-1, l'IL-3, l'IL-6 et l'IL-11 stimulent la différenciation de la cellule souche pluripotente en cellule souche myéloïde, puis en CFU-GEMM (*CFU-granulocyte, erythroid, monocyte, megakaryocyte*). Il semble que le récepteur de l'EPO soit exprimé principalement à la surface des cellules de la lignée érythrocytaire entre le stade CFU-E et le stade normoblaste (Sawada et al., 1990; Wickrema et al., 1992). Peu de récepteurs de l'EPO sont exprimés sur les BFU-E et une faible réponse à l'EPO est observée dans ces cellules (Sawada et al., 1990). Le nombre le plus élevé de récepteurs de l'EPO est observé sur les CFU-E et les pronormoblastes (Sawada et al., 1990; Wickrema et al., 1992). Le nombre de récepteurs par cellule diminue graduellement au cours de la différenciation de la lignée érythrocytaire et des études ont montré que le réticulocyte et l'érythrocyte mature ne contiennent pas de récepteurs de l'EPO (Koury et al., 1987; Sawada et al., 1990; Wickrema et al., 1992).

5.8.2. Effets de l'hypoxie sur l'érythropoïèse

Il a été démontré que dans des conditions de basse tension en oxygène, la hausse de l'EPO sérique constatée moins de 24 heures après le début de l'hypoxie était suivie d'une diminution graduelle même lorsque l'hypoxie persistait (Abbrecht et Littell., 1972; Fried et al., 1970; Milledge et Cotes., 1985). Biljanovic-Paunovic et ses collaborateurs (1996) ont étudié les mécanismes qui influencent la synthèse d'EPO et l'augmentation de la masse érythrocytaire dans des conditions d'hypoxie chronique. Ils ont examiné la production d'EPO et les précurseurs de la lignée érythrocytaire (CFU-E) chez des rats soumis à une hypoxie normobare (PaO₂ de 55 mm Hg) pendant 24 heures ou pendant une, deux, trois ou quatre semaines. Les résultats ont révélé que l'hypoxie provoquait une hausse de l'hématocrite, de la concentration d'hémoglobine et du nombre de globules rouges, l'hématocrite atteignant un plateau après deux semaines. Après 24 heures d'hypoxie, les concentrations d'EPO étaient 20 fois plus élevées, cette hausse étant suivie d'une baisse. Après la première semaine d'hypoxie, les valeurs de la concentration d'EPO étaient encore supérieures à celles des témoins, mais après deux semaines et plus, elles n'étaient plus significativement différentes des valeurs normales. Les changements dans le nombre de CFU-E ont suivi les changements dans la concentration d'EPO, ont doublés après 24 heures d'hypoxie, une augmentation additionnelle au cours des deux semaines suivantes avec un maximum le 14^e jour puis un déclin progressif au moment où la concentration d'EPO était normale. Les changements observés dans la concentration d'EPO (concentrations élevées d'EPO après le début de l'exposition à l'hypoxie et déclinant après sept jours) sont semblables à ceux signalés par d'autres chercheurs dont les concentrations maximales d'EPO ont été décelées après une période de six heures à trois jours (Fried et al., 1983; Schooley et Mahlmann., 1975; Seferynska., 1989). Le nombre de CFU-E, plus élevé que la normale observé durant les deux dernières semaines d'hypoxie, reflète probablement le niveau nécessaire au maintien de l'équilibre atteint dans des conditions d'hypoxie persistante. La concentration normale d'EPO observée au cours de cette période pourrait suffire à maintenir le taux existant d'érythropoïèse, comme l'ont suggéré d'autres chercheurs (Milledge et Cotes, 1985; Cotes et al., 1986).

En 1999, Kalaidjieva a décrit les effets d'une stimulation par hypoxie hypobare (42,55 kPa pendant six heures) sur la concentration d'EPO et le nombre de réticulocytes chez le rat. Les résultats indiquent que la concentration d'EPO chez les animaux ayant subi une hypoxie hypobare traités (40,5 mU/mL) était plus élevée que chez les animaux témoins

(13,83 mU/mL) immédiatement après l'hypoxie. Le nombre absolu de réticulocytes était également élevé, dès la fin de l'application de l'hypoxie hypobare de six heures. Aucune différence dans la concentration d'EPO n'a été constatée entre les rats témoins et les rats exposés à une hypoxie hypobare, 24 heures ou 72 heures après l'expérience.

5.8.3. Effets d'une augmentation de l'érythropoïèse consécutive à une hypoxie

En réponse à l'hypoxie, le rein adulte accroît la synthèse de l'EPO (Jelkmann, 1992) et amène les précurseurs de la lignée érythrocytaire à produire un plus grand nombre d'érythrocytes matures, augmentant ainsi la capacité de transport de l'oxygène (Erslev et al., 1989; Jelkmann, 1994). Les concentrations plasmatiques élevées d'EPO entraînent à leur tour une hausse de la masse érythrocytaire et peuvent causer une augmentation considérable de l'hématocrite et, par conséquent, de la viscosité du sang. Cet accroissement de la viscosité peut avoir des effets défavorables dans l'ischémie cérébrale. Il est bien connu que le déterminant principal de la viscosité du sang entier est l'hématocrite (Harrison, 1989). Les hausses de l'hématocrite pourraient épuiser le NO et, par conséquent, altérer le débit sanguin (McMahon et al., 2002; Rao et Stamler, 2002; Ruschitzka et al., 2000). Des animaux transgéniques surexprimant l'EPO meurent rapidement d'un dysfonctionnement cardiovasculaire lorsqu'on leur administre un inhibiteur de la NO synthase (Ruschitzka et al., 2000). En outre, l'EPO peut élever la tension artérielle et la fréquence des thromboses (Rao et Stamler, 2002). Enfin, des hausses de l'hématocrite ont été associées à une surmortalité chez des patients atteints de cardiopathie ischémique (Berarab et al., 1998; Hebert et al., 1999).

5.8.4. Effets de valeurs élevées d'hématocrite après ischémie cérébrale aiguë

Les modifications d'ordre hémorhéologique jouent un rôle important dans la physiopathologie de l'AVC ischémique (Gotoh et Lechner, 1986). Gotoh et son collaborateur ont observé que différents paramètres hémorhéologiques tels que la viscosité du sang entier, la viscosité plasmatique, la déformabilité érythrocytaire et la concentration sérique de fibrinogène, sont altérés dans l'AVC. Des paramètres hémorhéologiques tels que la viscosité du sang entier, l'hématocrite, la capacité de filtration des globules rouges et la concentration sérique de fibrinogène, en présence d'une affection vasculaire cérébrale chronique sont statistiquement différents des mêmes paramètres chez des sujets témoins. Hussain et Puniyani (1995) ont décrit que la viscosité sanguine était significativement plus

élevée chez des patients ayant subi un AVC que chez des témoins (Ott, 1986). Thomas (1982) a examiné l'hématocrite et la tension artérielle chez des patients ayant subi un AVC aigu. Ils ont montré que les patients présentant un hématocrite élevé étaient plus à risque d'infarctus lacunaire. Cela pourrait être dû à l'augmentation rapide de la viscosité sanguine qui accompagne la hausse de l'hématocrite et à la relation inverse entre la viscosité sanguine et le débit sanguin cérébral.

Bien que l'hémodilution accroisse l'irrigation dans le cerveau ischémique, elle diminue également la capacité du sang à transporter l'oxygène. Il existe une relation importante entre le débit sanguin cérébral et la teneur du sang artériel en oxygène, le débit sanguin cérébral se modifiant au besoin pour maintenir le transport de l'oxygène au cerveau à l'intérieur de certaines limites (Brown et al., 1985). Il est probable que chez le sujet normal, le débit sanguin se maintienne en dépit de valeurs d'hématocrite élevées, en raison du mécanisme de régulation métabolique intrinsèque de la circulation cérébrale. Toutefois, dans le cerveau ischémique, ayant perdu la capacité d'autorégulation du débit et dans lequel les vaisseaux sont déjà dilatés au maximum, les facteurs hémorhéologiques deviennent des déterminants très importants du débit sanguin (Friedland et Grant, 1979). La manipulation de la viscosité sanguine offre alors un moyen efficace et rapide d'accroître l'irrigation des régions ischémiques du cerveau et le traitement par hémodilution améliore la microcirculation dans la zone de pénombre ischémique, en diminuant la viscosité sanguine (Gilroy et al., 1969).

5.9. Conclusion

La production accrue d'EPO dans le rein représente le principal mécanisme d'adaptation à l'hypoxie par l'organisme. Une augmentation des érythrocytes, ainsi que de l'hématocrite et de l'hémoglobine se produit et assure ainsi un rétablissement de l'état homéostatique de l'oxygène. Des changements marqués de l'expression de l'EPO et de son récepteur ont été notés dans le tissu cérébral après une lésion ischémique. Il semble aussi que l'EPO soit neuroprotecteur pour le tissu cérébral et il a été observé que les astrocytes et les neurones produisaient l'EPO. Cependant, on ignore encore l'impact de l'ischémie cérébrale aiguë sur les niveaux d'EPO en périphérie.

CHAPITRE 6

RÔLE DES CELLULES ET DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES EN RÉPONSE À L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE AIGUË

6.1. Introduction

La progression histologique de l'inflammation post-ischémique est comprise depuis pas mal de temps, mais on a récemment fait des progrès considérables dans la compréhension des voies biochimiques associées à l'inflammation et leur rôle dans l'exacerbation des lésions tissulaires. Il est de plus en plus évident que l'inflammation due à un AVC joue un rôle-clé dans les lésions neuronales (Barone et Feuerstein, 1999; Beamer et al., 1995; DeGraba, 1998; Giulian et Vaca, 1993). De récentes données permettent de penser que cette réaction inflammatoire pourrait contribuer aux lésions tissulaires précoces et tardives qui suivent l'AVC, d'où la possibilité intéressante d'influencer la cascade inflammatoire avec un traitement dans le but de réduire les lésions ischémiques. L'inflammation est médiée par des cellules, comme la microglie et les leucocytes provenant du sang circulant et des molécules solubles comme les cytokines, dont un bon nombre possèdent des propriétés pro- ou anti-inflammatoires à l'origine d'effets néfastes ou bénéfiques (Barone et Feuerstein, 1999; Dirnagl et al., 1999; Stoll et al., 2002).

Des expériences sur l'ischémie ont démontré, en effet, qu'un processus inflammatoire cellulaire-clé se produit à l'interface entre le sang et les cellules endothéliales des vaisseaux de petit calibre (Hallenbeck, 1996). La microglie, les astrocytes, les cellules endothéliales et les neurones locaux libèrent des cytokines, comme l'IL-1 β et le TNF- α , qui influencent ce processus (del Zoppo et al., 2000). En l'espace de quelques minutes, ou de quelques heures après la réduction du débit sanguin cérébral, des leucocytes sont recrutés, activés et adhèrent à l'endothélium de petits vaisseaux cérébraux. Les leucocytes activés obstruent les petits vaisseaux cérébraux en cause (del Zoppo et al., 1991), et des neutrophiles et des monocytes/macrophages migrent dans la zone de l'infarctus cérébral à travers la paroi vasculaire (Garcia et al., 1994). La reperfusion influence peut-être aussi l'étendue des lésions inflammatoires; de plus, il est possible que l'inflammation liée à la reperfusion limite l'efficacité du traitement thrombolytique de l'AVC aigu (Jean et al., 1998). En plus de la réponse inflammatoire centrale, des processus

inflammatoires systémiques se produisent également, avant et après l'AVC aigu. C'est pourquoi des modifications du moment et/ou de la composition des réponses cellulaires inflammatoires pourraient influencer l'étendue des lésions neuronales. Dans les pages qui suivent, nous allons décrire les principales cellules et cytokines qui interviennent dans l'inflammation post-ischémique, en insistant sur leurs effets délétères.

6.2. Réponse cellulaire après ischémie cérébrale aiguë

L'ischémie cérébrale focale déclenche l'activation de la microglie et des astrocytes locaux, de même que le recrutement de granulocytes, de lymphocytes T et de macrophages provenant de la périphérie. Le rôle de cette réponse inflammatoire dans l'exacerbation de la mort neuronale et le remodelage tissulaire après une ischémie cérébrale n'a pas été élucidé (Stoll et al., 1998). La microglie et les macrophages sécrètent un certain nombre de molécules effectrices toxiques ou protectrices et jouent donc un rôle-clé dans les processus inflammatoires du SNC (Arvin et al., 1996; Banati et Graeber, 1994; Banati et al., 1993; Giulian et al., 1994; Lees, 1993). Schroeter et d'autres chercheurs ont démontré que les réponses de la microglie et des macrophages, après une ischémie cérébrale focale, sont hétérogènes relativement aux caractéristiques spatio-temporelles de l'activation cellulaire et aux types de cellules recrutées (Jander et al., 1998; Lehrmann et al., 1997; Schroeter et al., 1997; Schroeter et al., 1999). Il est bien connu que les leucocytes jouent des rôles cruciaux dans la défense normale de l'hôte et il y a de plus en plus lieu de croire que les neutrophiles, en particulier, pourraient être des médiateurs de lésions cérébrales secondaires en présence d'ischémie cérébrale et de reperfusion. Les cellules microgliales sont les premières cellules non neuronales à répondre aux lésions du SNC; elles sont la principale source de cytokines et d'autres molécules immunitaires dans le SNC, et deviennent des phagocytes après leur activation complète par la mort de neurones (Emsley et Tyrrell, 2002).

6.2.1. Microglie, macrophages et astrocytes

La plupart des données sur la microglie dans l'ischémie cérébrale proviennent de travaux expérimentaux. Les cellules microgliales ramifiées ou «au repos» constituent 5 % à 20 % de l'ensemble des cellules gliales du SNC. Après une ischémie cérébrale focale, elles subissent des changements substantiels de forme et d'activité métabolique. Elles s'hypertrophient, leurs prolongements raccourcissent et elles subissent une régulation

génique positive rapide et profonde, le degré d'activation étant fonction du temps et de l'étendue des lésions (Kato et Walz, 2000; Zhang et al., 1997). Chez des rongeurs, on a constaté que les cellules microgliales et les macrophages étaient la principale source de cytokines telles que l'IL-1 β , le TNF- α et le TGF- β dans le SNC (Gregersen et al., 2000; Lehrmann et al., 1998; Rothwell, 1999).

6.2.1.1. Microglie et macrophages

La microglie répond à presque tous les événements pathologiques (Kreutzberg, 1996). Les cellules microgliales peuvent exercer plusieurs fonctions en se transformant en phagocytes, en présentant des antigènes à des lymphocytes T ou en produisant des facteurs neurotoxiques (Banati et al., 1993; Lees, 1993). Les cellules microgliales résidentes expriment le récepteur du complément de type 3 (CR-3; complexe CD11b/CD18) reconnu par l'anticorps monoclonal (AcM) OX42 chez le rat. Une fois activés, elles expriment des molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), le récepteur CD4 et des phagolysosomes reconnus par l'AcM ED1⁺ (Flaris et al., 1993). L'activation est souvent accompagnée d'une transformation avec perte de la forme ramifiée typique. Quelques heures après l'occlusion permanente de l'ACM et dans le modèle de photothrombose, l'immunoréactivité de l'AcM OX42 sur la microglie est augmentée dans la zone ischémique, les prolongements des cellules microgliales raccourcissent et disparaissent (Stoll et al., 1998). Les cellules microgliales en périphérie de la zone infarctée se transforment en phagocytes (Schroeter et al., 1997).

L'activation microgliale semble être le premier changement inflammatoire cellulaire dans les modèles murins d'AVC. Les macrophages (et probablement les cellules microgliales activées) sont abondants entre le 1^{er} et le 5^e jour après l'occlusion chez le rat et la souris (Feuerstein et al., 1994; Morioka et al., 1993; Van Beek et al., 2000). Dans un modèle d'ischémie focale permanente chez la souris, Gregersen et ses collaborateurs (2000) ont constaté une activation modeste de la microglie à la 6^e heure, se manifestant par une augmentation de l'immunoréactivité de CD11b/AcM1. Il a été rapporté que les cellules microgliales étaient des indicateurs sensibles d'ischémie. Abraham et Lazar (2000) ont démontré une activation microgliale dans un modèle d'ischémie légère du cerveau antérieur chez le rat (20 minutes) immédiatement après l'occlusion. Cependant, le taux d'activation n'atteignait plus que la moitié au bout de cinq heures et le quart au bout de 24 heures. Cette

réduction de l'activation était sans doute due à la brièveté de l'occlusion, par comparaison avec une ischémie plus longue et plus néfaste.

Par ailleurs, au cours des premiers jours suivant un infarctus déclenché par photothrombose, on a observé que les phagocytes situés en bordure de la zone infarctée provenaient surtout de la microglie locale, alors que les macrophages circulants étaient recrutés plus tard (Schroeter et al., 1994). La réponse des macrophages semble être plus vigoureuse dans le modèle d'occlusion de l'ACM que dans celui d'ischémie par photothrombose. Le retard de la réponse des macrophages, dans ce dernier modèle, est très compatible avec les résultats d'une étude histologique approfondie de Clark et ses collaborateurs (1993) qui ont constaté une grande profusion de macrophages dans la zone infarctée à partir du 5^e jour et jusqu'à la régression des lésions, 30 jours après l'occlusion permanente de l'ACM. Zhang et ses collaborateurs (1997) ont décrit la cinétique de la réponse microgliale dans un modèle d'occlusion temporaire (2 heures) de l'ACM chez le rat Wistar. Des cellules microgliales rondes et amiboïdes sont devenues prédominantes dans la zone centrale ischémique, tandis qu'elles coexistaient avec des cellules microgliales très ramifiées en bordure de cette zone, 22 heures après le début de la reperfusion. Des cellules microgliales très ramifiées se trouvaient dans une zone adjacente contenant des neurones de forme intacte. Les cellules microgliales rondes et amiboïdes se limitaient à la bordure interne de la lésion ischémique, entourant la zone infarctée, au bout de 46 heures. À partir de 70 - 166 heures, des cellules microgliales rondes et amiboïdes étaient présentes dans toute la lésion ischémique de la zone infarctée. On pouvait observer une réduction marquée du nombre et de l'intensité des cellules microgliales très ramifiées à l'extérieur de la lésion durant cette période. Des résultats similaires ont été rapportés par Kato et ses collaborateurs (1996), ainsi que Lehrmann et ses collaborateurs (1997), chez le rat génétiquement hypertendu. Dans les zones de pénombre, un recrutement et une activation précoces de cellules microgliales et de macrophages, traduits par la régulation positive de molécules immunitaires, contrastaient avec l'envahissement massif retardé de phagocytes dans le noyau caudé et le putamen nécrosés. Ces études ne nous indiquent pas dans quelle proportion ces phagocytes provenaient de la microglie ou de la circulation.

La pertinence de la microglie dans les AVC cliniques *in vivo* fait l'objet d'études basées sur de nouvelles techniques d'imagerie. La tomographie par émission de positons avec [¹¹C]PK11195, un marqueur du récepteur périphérique de benzodiazépine qui est exprimé sur les microglies activées, a permis de mettre en évidence des cellules

microgliales activées dans des infarctus des territoires des artères cérébrales moyenne et postérieure, chez des patients ayant subi un AVC ischémique (Gerhard et al., 2000) et dans les lésions thalamiques ipsilatérales secondaires, chez des patients ayant un infarctus dans le territoire de ACM (Pappata et al., 2000). Une telle activation microgliale peut être présente pendant plusieurs semaines après le début de l'infarctus cérébral.

6.2.1.2. Astrocytes

L'astrogliose réactionnelle est un élément-clé de la réponse cellulaire à une lésion du SNC (Ridet et al., 1997). Beaucoup d'études indiquent que des mécanismes inflammatoires modulent à la fois la prolifération et les activités de biosynthèse des astrocytes réactifs (Balasingam et Yong, 1996; Smith et Hale, 1997; Yong et al., 1991). Ces cellules exercent peut-être des effets néfastes et des effets bénéfiques durant la réparation de tissus lésés du SNC (Brodie, 1996; Fitch et Silver, 1997; Ridet et al., 1997; Yoshida et al., 1992). Les astrocytes réactifs ont exprimé le facteur de croissance des nerfs (NGF pour Nerve Growth Factor), ce qui porte à croire qu'ils contribuent à la survie des neurones après une occlusion temporaire de l'ACM chez le rat Wistar (Lee et al., 1996). L'importance fonctionnelle de la réponse astrocytaire aux infarctus cérébraux focaux reste à déterminer. L'astrogliose réactionnelle consécutive à une lésion du SNC a été considérée comme un obstacle majeur à une régénération axonale. Or, dans certaines conditions, les astrocytes réactifs sécrètent des neurotrophines et fournissent un substrat favorable à la repousse axonale (Ridet et al., 1997).

Les astrocytes peuvent être mis en évidence par immunocytochimie, en détectant leur protéine gliofibrillaire acide (GFAP, glial fibrillary acidic protein), un filament intermédiaire. La GFAP est exprimée constitutivement dans les astrocytes fibreux de la substance blanche et beaucoup moins, dans les astrocytes protoplasmiques, qui constituent la plupart des astrocytes de la substance grise. Le passage de l'état de repos à l'état réactif s'accompagne d'une augmentation du nombre de filaments intermédiaires appelés vimentine (Schiffer et al., 1986). L'hypertrophie et l'hyperplasie des astrocytes, de même que la régulation positive de la protéine GFAP, sont quelques-unes des caractéristiques les plus frappantes de l'ischémie focale permanente chez les rats avec hypertension spontanée (SHR) et apparaissent au cours des deux premiers jours à la périphérie de la lésion (Clark et al., 1993). Une réponse astrocytaire similaire accompagnée de la régulation positive de la GFAP et de la vimentine a été constatée après trois jours à la périphérie de lésions causées

par photothrombose et a donné lieu à la formation de tissu cicatriciel au stade atrophique au 60^e jour (Schroeter et al., 1995). Yamashita et ses collaborateurs (1996) ont démontré une augmentation de l'ARNm de la GFAP par hybridation *in situ* six heures après l'occlusion permanente de l'ACM, dans le cortex cingulaire de l'hémisphère lésé, qui s'est propagée graduellement à la partie latérale du cortex ipsilatéral et au striatum, entre la 12^e heure et le 3^e jour. Dans le modèle de l'occlusion temporaire (2 h) de l'ACM, à partir du 2^e jour suivant le début de la reperfusion, les astrocytes GFAP-positifs avaient diminué en nombre et n'étaient presque plus détectables au centre de la lésion, mais ils étaient plus nombreux et très intenses à la périphérie des lésions, et ce, jusqu'au 7^e jour (Chen et al., 1993; Li et al., 1995). Après 30 minutes d'occlusion temporaire de l'ACM, certains astrocytes exprimaient la protéine associée à la croissance GAP43/B-50 autour des lésions infarctées du 3^e au 14^e jour, mais avaient disparu au 30^e jour (Yamada et al., 1994).

À distance des lésions ischémiques causées par photothrombose, les astrocytes corticaux de tout l'hémisphère ipsilatéral ont présenté une régulation positive temporaire de la GFAP, mais pas de la vimentine à compter du 3^e jour (Schroeter et al., 1995). Cette réponse était toujours présente le 6^e jour et avait disparu le 14^e jour. Des résultats similaires ont été obtenus à l'échelle de l'ARNm, après une occlusion permanente de l'ACM (Yamashita et al., 1996).

6.2.1.3. Observations histopathologiques de la microglie et des macrophages chez l'humain après ischémie cérébrale aiguë

Peu d'études basées sur des techniques immunocytochimiques modernes ont permis d'approfondir les descriptions histopathologiques classiques des infarctus cérébraux humains. D'après les examens histopathologiques, une nécrose tissulaire complète, l'infiltration de leucocytes polynucléaires au bord des infarctus humains, la phagocytose des débris, et enfin, la formation de kystes, ont été décrits (Graham et Brierley, 1984).

Des macrophages s'accumulaient dans les infarctus étudiés après 5 ± 9 jours et étaient le plus abondants dans la zone centrale des infarctus 17 et 18 jours après le début de l'AVC. Dans une petite série d'infarctus humains étudiés après 5 à 14 jours, Stoll et ses collaborateurs (1998) ont constaté l'accumulation de phagocytes à la périphérie des infarctus au cours de la première semaine, aussi observé dans des AVC expérimentaux. Au voisinage des infarctus, les cellules microgliales étaient activées et exprimaient des

molécules de classe II du CMH. Dans certaines zones, on a pu suivre la transformation des cellules microgliales ramifiées en phagocytes près de la limite des zones infarctées.

6.2.2. Infiltration des PMN et des lymphocytes T après ischémie cérébrale aiguë

Il est généralement reconnu que l'ischémie-reperfusion donne lieu à une réponse inflammatoire qui met en jeu l'infiltration de polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) dans le tissu ischémique. Le rôle de cet afflux de PMN dans l'apparition des lésions déclenchées par l'ischémie a fait l'objet de nombreuses études, y compris des études sur le recours à diverses stratégies de réduction ou de prévention de l'accumulation des PMN dans l'ischémie cérébrale focale temporaire. Les PMN pourraient contribuer aux lésions ischémiques en participant au stress oxydatif, un phénomène connu pour être délétère dans les cas d'AVC (Chan, 2001; Gilgun-Sherki, 2002; Love, 1999). Les PMN peuvent, en effet, produire des radicaux libres oxygénés par le biais de deux enzymes, la NADPH-oxydase associée à la membrane et la myéloperoxydase (MPO) (Babior, 2000; Hansen, 1995; Jordan et al., 1999; Witko-Sarsat et al., 2000).

Beray-Berthet et ses collaborateurs (2003) ont mené des études pour déterminer si l'infiltration des PMN contribuait aux lésions cérébrales et au stress oxydatif dans le cortex et le striatum, dans un modèle d'ischémie cérébrale focale temporaire. Ils ont obstrué l'ACM gauche et l'artère carotide commune ipsilatérale pendant deux heures chez le rat. L'administration de vinblastine (0,5 mg/kg par voie i.v.), un agent neutropénique, a produit une chute importante du nombre de PMN circulants, qui s'accompagnait de 80 % de diminution de l'activité de la myéloperoxydase, un marqueur de l'infiltration des PMN, à la fois dans le cortex et le striatum. Dans le cortex, les animaux traités par la vinblastine ont présenté 44 % de réduction du volume infarcté et un stress oxydatif réduit (évalué par la baisse de la concentration de glutathion). Dans le striatum, par contre, la neutropénie n'a modifié ni la taille de la lésion ni le stress oxydatif, ce qui porte à croire que le rôle des PMN dans les lésions post-ischémiques et le stress oxydatif dépend de l'aire cérébrale en cause.

Des données expérimentales en faveur d'un rôle de la pression de l'oxygène dans la régulation de la fonction des PMN proviennent d'études *in vitro* au cours desquelles des PMN humains exposés à une hypoxie, semblable à celle qui pourrait exister à des sites d'inflammation aiguë (PaO_2 de 15 mmHg), étaient préactivés pour une phagocytose accrue (Knowles et al., 1995; Knowles et al., 1997; Simms et D'Amico., 1994) et une activité

microbicide (Knowles et al., 1997) en réponse à une stimulation par des cytokines. L'accroissement de la réactivité des PMN dans ces conditions était associé à une augmentation de l'expression des récepteurs pour les opsonines (Knowles et al., 1997) et à une régulation positive de l'expression des récepteurs de type I de l'IL-1 β (IL-1 β RI), du TNF- α (p80) et de l'IL-8 (Simms et D'Amico., 1996).

La cascade inflammatoire qui suit une ischémie focale a été bien décrite chez des rongeurs. Chez le rat, les premiers signes d'inflammation apparaissent six heures après une ischémie focale, avec une infiltration à prédominance neutrophilique dans le tissu lésé. Entre les 5^e et 15^e jours, on observe une gliose réactionnelle et la composition de l'infiltrat inflammatoire change lentement, passant de cellules polynucléaires à des cellules mononucléées. Le 15^e jour, les neutrophiles sont essentiellement absents (Clark et al., 1994). La lésion chronique est caractérisée par la cavitation, l'enlèvement continu de tissu nécrosé et conjonctif par les macrophages et la formation d'une cicatrice gliale. Fait à signaler, cette évolution peut être nettement retardée dans les modèles d'ischémie focale permanente. L'infiltration des neutrophiles se produit plus tôt et dans une plus grande mesure dans les tissus reperfusés que dans les tissus en ischémie permanente (Clark et al., 1993).

Des études réalisées après occlusion transitoire de l'ACM chez la souris, montrent qu'à la suite du recrutement des cellules microgliales activées et des macrophages, l'infiltration des neutrophiles est significative autour de 48 h et elle reste élevée 96 h post-occlusion, alors que le nombre de lymphocytes T infiltrants augmente plus tardivement (72-96 h) après occlusion (Stevens et al., 2002).

L'équipe de Schroeter et Jander a observé la présence de phagocytes CD8⁺ dans l'infiltrat leucocytaire après occlusion transitoire (Schroeter et al., 2001) ou permanente (Jander et al., 1995; Schroeter et al., 1994) de l'ACM chez le rat. Ces cellules CD8⁺ ne sont pas des lymphocytes T parce qu'elles n'expriment pas le marqueur CD5 caractéristique des lymphocytes T chez le rat et on en ignore encore leur nature exacte.

Une étude récente a analysé la littérature concernant le rôle des PMN infiltrant le cerveau dans l'ischémie cérébrale (Emerich et al., 2002). Cette étude soulève les limites des travaux antérieurs, notamment celles liées à l'absence d'études cinétiques. Elle conclut que des études additionnelles sont nécessaires pour établir les relations de cause à effet entre

l'accumulation des PMN dans le cerveau et leur rôle dans la pathogenèse de l'AVC (Emerich et al., 2002).

6.2.3. Rôle des sélectines et des intégrines dans l'infiltration des leucocytes après ischémie cérébrale aiguë

On sait que les infarctus corticaux sont infiltrés temporairement par des PMN et pendant plus longtemps par des macrophages (Garcia et al., 1994; Hallenbeck et al, 1986; Kochanek et Hallenbeck, 1992). Cette réponse inflammatoire des PMN met en jeu plusieurs étapes d'adhérence cellulaire qui permettent aux leucocytes d'accéder au cerveau à travers la paroi endothéliale. Des lymphocytes patrouillent continuellement à la recherche d'antigènes étrangers, en passant du sang aux tissus et des tissus au sang. Des granulocytes et des monocytes/macrophages sortent de la circulation sanguine, en réponse à des changements moléculaires à la surface des vaisseaux sanguins qui leur signalent la présence d'une lésion ou d'une infection. Plusieurs familles de protéines, ayant chacune une fonction distincte, donnent des signaux aux leucocytes (Clark et Zivin, 1997; Schroeter et al., 1994). Trois grandes étapes interviennent: 1) le roulement, 2) l'adhérence et 3) la migration transendothéliale des leucocytes. Ces trois étapes sont facilitées par l'interaction entre certains ligands exprimés de manière constitutive à la surface des leucocytes et les récepteurs membranaires situés à la surface des cellules endothéliales qui sont inductibles par des stimuli inflammatoires. Le roulement des leucocytes le long de l'endothélium réduit leur vitesse dans le sang. Il est médié par les sélectines. La L-sélectine est exprimée sur tous les leucocytes; les récepteurs P-sélectine et E-sélectine peuvent être induits sur les cellules endothéliales par des cytokines inflammatoires. La liaison des leucocytes à la paroi vasculaire est renforcée sous l'influence de chimiokines libérées du côté de la lésion. Le processus d'adhérence qui s'ensuit est médié par des molécules d'adhérence de la famille des intégrines (figure 14). Différentes molécules dirigent l'adhérence des sous-groupes de leucocytes : les lymphocytes portent constitutivement les intégrines CD11a/CD18, LFA-1 (Leukocyte Function Associated Antigen-1) et VLA-4 (Very-Late-Antigen-4) à leur surface; les monocytes, les intégrines LFA-1, VLA-4 et CD11b/CD18 [MAC-1 ou CR-3 (Complement Type 3 Receptor)] et les granulocytes, les intégrines LFA-1 et CD11b/CD18. Les ligands endothéliaux correspondants sont la molécule d'adhérence intercellulaire 1 (ICAM-1) pour les intégrines LFA-1 et CD11b/CD18 et la molécule d'adhérence vasculaire 1 (VCAM-1) pour l'intégrine VLA-4. L'ICAM-1 et la VCAM-1 sont habituellement peu

exprimées sur les cellules endothéliales, mais elles sont fortement augmentées par les cytokines dans les maladies inflammatoires (Cannella et al., 1990). Les leucocytes infiltrants contribueraient aux lésions ischémiques secondaires en produisant des substances toxiques qui tuent les neurones cérébraux et perturbent la barrière hémato-encéphalique (del Zoppo et Hallenbeck, 2000; Loddick et Rothwell, 1996). Une infiltration se produit quand des leucocytes se lient à l'ICAM-1 et cette dernière est augmentée après une ischémie (Zhang et al., 1995).

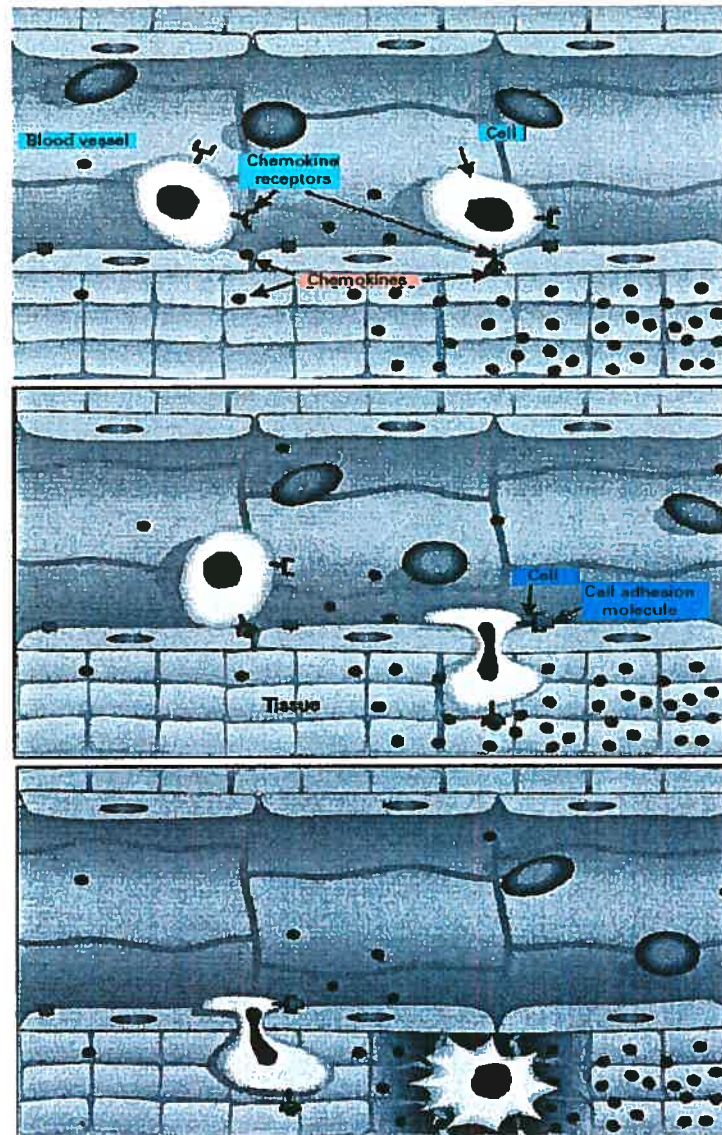


Fig 14. Transport des leukocytes du sang vers les tissus. (Tiré de Mucke, 2000)

Deng et ses collaborateurs (2003), ainsi que d'autres équipes, ont constaté qu'une légère hypothermie durant une ischémie diminuait l'expression de l'ICAM-1 (Wang et al., 2002), l'infiltration de neutrophiles (Inamasu et al., 2000; Maier et al., 1998; Toyoda et al., 1996) et la perturbation de la barrière hémato-encéphalique (Dietrich et al., 1990a; Karibe et al., 1994) après un AVC expérimental. C'est ainsi que des leucocytes sont dirigés vers le site de la lésion. Des molécules d'adhérence cellulaire sont exprimées peu après une ischémie cérébrale focale, permanente ou temporaire, sur les vaisseaux de petit calibre; cette expression précède l'adhérence de leucocytes aux cellules endothéliales et leur migration dans le tissu ischémique. Stoll et ses collaborateurs (1998) ont observé que l'expression de l'ICAM-1 commençait dans les quatre heures sur les cellules endothéliales et qu'elle était la plus prononcée au cours des trois premiers jours suivant une ischémie par occlusion permanente de l'ACM ou photothrombose (Jander et al., 1995; Schroeter et al., 1994). Le 3^e jour, un marquage additionnel d'ICAM-1 est apparu à la surface de leucocytes infiltrants. Le 7^e jour, l'immunoréactivité de l'ICAM-1 était fortement réduite. Wang et Feuerstein (1995) ont démontré la régulation positive de l'ARNm de l'ICAM-1 trois heures après l'occlusion permanente de l'ACM chez le rat; la concentration d'ARNm a atteint son maximum après 6 - 12 heures et est resté élevé pendant une période allant jusqu'à cinq jours. Le signal immunocytochimique de l'ICAM-1 était localisé dans des cellules endothéliales de vaisseaux sanguins intraparenchymateux du cortex ischémique. L'ARNm de la molécule d'adhérence leucocytaire endothéliale 1 (ELAM-1) subissait également une régulation positive (Wang et al., 1995b; Wang et Feuerstein, 1995). Une analyse de l'évolution temporelle a révélé que l'expression accrue de l'ICAM-1 et de l'ELAM-1 se produisait en même temps que celle de chimiokines, mais plus tard que celle du TNF- α et de l'interleukine-1bêta (IL-1 β) qui, on le sait, induisent l'expression de l'ICAM-1 et de l'ELAM-1 sur les cellules endothéliales (Briscoe et al., 1992; Dustin et al., 1986). De plus, l'ARNm de la VCAM-1 a été détecté sur des cellules endothéliales par hybridation *in situ*, son taux atteignant un maximum le 3^e jour à la périphérie des lésions photothrombotiques (Jander et al., 1996).

Dans le modèle de l'occlusion temporaire (1 - 2 h) de l'ACM du rat, l'ARNm de l'ICAM-1 était détectable par Northern blot aussi peu qu'une heure après le début de l'ischémie et a atteint son maximum 10 heures après le début de la reperfusion. Des taux élevés ont persisté pendant une semaine. En même temps, l'expression de la protéine

ICAM-1 a augmenté dans la zone ischémique (Zhang et al., 1995). Okada et ses collaborateurs (1994), ont constaté qu'une régulation positive de la P-sélectine commençait durant l'ischémie temporaire chez le babouin comme chez le rat (Zhang et al., 1998) et ont observé une régulation positive de l'ICAM-1 sur des cellules endothéliales à la 1^{re} et à la 4^e heure dans le territoire des artères lenticulo-striées chez le babouin. La E-sélectine a été mise en évidence avec un maximum à la 24^e heure dans les petits vaisseaux ischémiques et beaucoup moins, dans le tissu non ischémique, durant une ischémie cérébrale focale temporaire chez un primate non humain (Haring et al., 1996). Jusqu'à présent, l'expression de la VCAM n'a pas été étudiée après l'occlusion temporaire de l'ACM.

6.3. Rôle des cytokines dans la réponse à l'ischémie cérébrale aiguë

Les cytokines sont des polypeptides généralement associés à l'inflammation, à l'activation immunitaire et à la différenciation cellulaire ou à la mort cellulaire. De plus, elles régulent les interactions entre les cellules immunitaires telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B et les monocytes/macrophages et orchestrent ainsi les réponses immunitaires (Arai et al., 1990). En périphérie, les cytokines sont produites par des macrophages, des monocytes, des lymphocytes, des cellules endothéliales, des fibroblastes, des plaquettes et de nombreuses autres cellules activées, mais la microglie activée est leur principal site de synthèse dans le SNC. Les données en faveur du rôle des cytokines dans l'inflammation causée par un AVC dans le SNC et la périphérie, proviennent de modèles animaux et d'études cliniques, quoique dans ces dernières, il manque souvent de données sur l'évolution et la localisation cellulaire de l'expression des cytokines. Il est donc difficile de faire la distinction entre la réponse des cytokines à la lésion et l'expression précoce qui pourrait contribuer à la mort cellulaire. Les cytokines pro-inflammatoires classiques, l'IL-1 et le TNF- α , semblent exacerber les lésions ischémiques cérébrales, alors que les molécules anti-inflammatoires, notamment l'interleukine-10 (IL-10) et l'antagoniste sélectif du récepteur de l'IL-1 (IL-1ra) qui est produit naturellement, semblent posséder des propriétés neuroprotectrices (Allan et Rothwell, 2001).

Une meilleure compréhension du rôle des cytokines pro- et/ou anti-inflammatoires dans la modulation de la réponse du cerveau à une lésion ischémique pourrait donner lieu à de nouvelles stratégies pharmacologiques, pour minimiser les lésions cérébrales consécutives à un AVC. Des travaux préliminaires sur des modèles animaux permettent de penser que des antagonistes du récepteur de l'IL-1 et du facteur d'activation des plaquettes

ont un effet protecteur (Frerichs et al., 1990; Lindsberg et al., 1990; Relton et al., 1996). La mesure de cytokines pro-inflammatoires pourrait aussi fournir des renseignements diagnostiques et pronostiques et aiderait peut-être à reconnaître les patients en début d'AVC. En particulier, selon des constatations récentes, la production précoce d'IL-6, susceptible d'être détectée dans le LCR et le plasma, serait en corrélation avec la taille finale de l'infarctus après un AVC aigu chez l'humain (Fassbender et al., 1994; Tarkowski et al., 1995a).

Dans les lignes qui suivent, nous résumons brièvement les connaissances actuelles sur la séquence des événements impliqués dans la synthèse des cytokines après AVC, le rôle des cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF- α qui font l'objet d'une partie de notre travail, ainsi que les relations entre l'hypoxie et les cytokines aussi pertinentes pour notre étude.

6.3.1. Séquence des événements impliqués dans la synthèse des cytokines inflammatoires après AVC

Le déclenchement de l'expression de plusieurs gènes par l'ischémie cérébrale est parmi les premiers événements qui se produisent après un AVC (Barone et Feuerstein, 1999). On note la régulation positive de nombreux gènes pro-inflammatoires, y compris des facteurs de transcription, des protéines de choc thermique, des cytokines, des chimiokines et des molécules d'adhérence. Plusieurs de ces gènes sont régulés *in vitro* par le facteur nucléaire NF- κ B. Mentionnons, par exemple, le TNF- α , l'IL-1 β , l'interleukine-6 (IL-6), la NO-synthase (NOS), la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) et l'ICAM-1 (Baeuerle et Henkel, 1994). Le NF- κ B régule peut-être aussi l'expression génique dans l'AVC ischémique clinique, parce que ce facteur de transcription est induit dans les cellules gliales suite à un infarctus cérébral humain (Terai et al., 1996).

La séquence des événements inflammatoires et la production des cytokines qui accompagnent un épisode ischémique, ont été particulièrement bien étudiées au moyen de modèles animaux d'ischémie focale (Clark et al., 1994; Clark et al., 1995; Garcia et al., 1994; Schroeter et al., 1994). Les premiers changements suivant l'occlusion de l'ACM mettent en jeu l'activation de cellules résidentes non-neuronales (soit microglie et astrocytes), qui migrent vers le site de la lésion et produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α . Ces cytokines, et d'autres, interviendraient dans la médiation de la neurotoxicité qui suit un AVC (Beamer et al., 1995;

Feuerstein et al., 1997; Gelbard et al., 1993; Tarkowski et al., 1995a). Elles peuvent avoir aussi des propriétés anti-inflammatoires ou protectrices (voir effets des cytokines IL-1 β , TNF- α et IL-6 dans différents modèles in vivo et in vitro dans le Tableau III ci-après). De plus, la libération de ces cytokines et chimiokines (ex. MCP-1, MIP-1 α et CINC) favorise le recrutement de leucocytes en provenance de la périphérie. Les leucocytes infiltrants libèrent des cytokines pro-inflammatoires et d'autres cytotoxines, comme des radicaux oxygénés et des protéases, susceptibles de détruire le tissu ischémique. Des études sur l'inhibition de l'infiltration de leucocytes ont démontré une réduction des lésions neuronales, ce qui montre bien le rôle de l'inflammation dans l'exacerbation des lésions causées par un AVC (Clark et al., 1995; Groggaard et al., 1989).

6.3.2. Interleukine-1 (IL-1) et antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1ra)

Des modèles d'AVC expérimentaux ont fait progresser notre compréhension de l'IL-1 dans la neurodégénérescence (Allan et Rothwell, 2001; Rothwell, 1999) et donnent à penser qu'elle joue un rôle fonctionnel direct dans les lésions ischémiques cérébrales. L'administration centrale ou périphérique d'un IL-1ra recombinant à des rongeurs a réduit nettement les lésions cérébrales causées par une ischémie cérébrale (Relton et al., 1996; Relton et Rothwell, 1992), et la surexpression d'IL-1ra dans le cerveau inhibe également les lésions cérébrales ischémiques (Betz et al., 1995). L'administration d'un anticorps neutralisant anti-IL-1ra augmente les lésions cérébrales ischémiques chez le rat (Loddick et al., 1998), alors que l'injection d'un anticorps anti-IL-1 β est neuroprotecteur (Yamasaki et al., 1995). Jusqu'à présent, il n'y a eu que quelques rapports cliniques sur l'administration d'IL-1 β et d'IL-1ra à des patients ayant subi un AVC. Des concentrations sériques élevées de la protéine IL-1 β n'ont pas été détectées (Fassbender et al., 1994; Tarkowski et al., 1995a), même si la production intrathécale d'IL-1 β est possible (Tarkowski et al., 1995a). L'expression accrue de l'ARNm de l'IL-1 β dans des cellules mononucléées périphériques de un à trois jours après le début des symptômes, se normalisant dans les 20 à 31 jours, présentait une corrélation modérée avec le degré de déficit neurologique (Kostulas et al., 1999). Les concentrations plasmatiques d'IL-1ra sont élevées chez les patients dans les 4 \pm 2 jours (moyenne \pm écart-type) suivant un AVC ischémique aigu, accompagné ou non d'une infection, par comparaison avec les témoins sains (Beamer et al., 1995).

Tableau III. Effets pro- et anti-inflammatoires des cytokines IL-1 β , TNF- α et IL-6 dans différents modèles in vivo et in vitro

Cytokines et modèles expérimentaux	Effets observés	Espèces animales	Références
IL-1β			
Ischémie focale	Augmente le volume d'infarctus cérébral	Rat	Loddick et Rothwell, 1996
Traumatisme crânien	Inhibe l'angiogénèse à fortes concentrations	Rat	Giulian et al., 1989
Modèle animal de Parkinson	Favorise la croissance neuronale	Rat	Wang et al., 1994
<i>In vitro</i>	Induit les facteurs de croissance (NGF, FGFs)	Culture d'astrocytes de rat	Yoshida et al., 1992 Gadient et al., 1990
Traumatisme crânien	Induit l'angiogénèse à faibles concentrations	Rat	Giulian et al., 1989
TNF-α			
Ischémie focale	Augmente le volume d'infarctus cérébral	Rat	Barone et al., 1997
Animaux sains	Inhibe l'angiogénèse à fortes concentrations	Souris	Fajardo et al., 1992
<i>In vitro</i>	Protège les cellules embryonnaire de l'hippocampe de rat	Cellules embryonnaires de rat	Chen et al., 1994
<i>In vitro</i>	Induit les facteurs de croissance (NGF, FGFs)	Culture d'astrocytes de rat	Yoshida et al., 1992 Gadient et al., 1990
Animaux sains	Induit l'angiogénèse à faibles concentrations	Souris	Fajardo et al., 1992
Ischémie focale	Diminution du dommage neuronal	Souris mutante	Bruce et al., 1996
Animaux transgéniques	Développe spontanément une inflammation chronique du SNC	Souris transgénique sur-exprimant TNF- α	Probert et al., 1995
EAE	Sévère déficite neurologique avec hausse de la mortalité et démyélination des neurones	Souris mutante déficiente en TNF- α	Liu et al., 1998
IL-6			
Ischémie focale	Associé à une deterioration neurologique précoce	Humain	Vila et al., 2000
Ischémie focale	Diminution du volume d'infarctus cérébral	Rat	Loddick et al., 1998
<i>In vitro</i>	Réduction de la production de TNF	Cellules U-937	Aderka et al., 1989
Souris sensibilisées à la Bacille de Calmette-Guerin	Reduction de la production de TNF	Souris	Aderka et al., 1989
<i>In vitro</i>	Diminution de la production de IL-1 et TNF	Cellules mononucléaires humaines	Schindler et al., 1990
Modèle de choc septique	Diminue la mortalité associée au choc septique	Souris	Barton et Jackson, 1993

On a constaté que le taux d'ARNm de l'IL-1 β était élevé dans le cortex ischémique entre quelques heures et quatre jours suivant l'occlusion permanente de l'ACM chez des rats normotendus et des rats génétiquement hypertendus (Arvin et al., 1996; Buttini et al., 1994; Liu et al., 1993). Le taux d'ARNm de l'IL-1 β était plus élevé chez les rats génétiquement hypertendus que chez les rats normotendus. La régulation positive de l'IL-

1 β était accompagnée d'une augmentation des signaux intracellulaires transmis par les récepteurs de l'IL-1 (Wang et al., 1997).

6.3.3. Interleukine 6 (IL-6)

L'IL-6 semble participer à la réponse aux lésions cérébrales ischémiques focales puisqu'on a constaté l'induction de son ARNm (Wang et al., 1995a) et une augmentation spectaculaire de sa bioactivité dans l'hémisphère ischémique (Loddick et al., 1998) après l'occlusion de l'ACM chez le rat. L'injection intracérébroventriculaire d'IL-6 recombinante réduit nettement les lésions cérébrales ischémiques après l'occlusion de l'ACM chez le rat. Ceci porte à penser que cette cytokine est un inhibiteur endogène important de la mort neuronale durant l'ischémie cérébrale (Loddick et al., 1998). Dans une petite étude menée sur des patients en phase aiguë d'ischémie cérébrale, les concentrations d'IL-6 circulante ont augmenté significativement et atteint un plateau entre 10 heures et trois jours, avant de se normaliser au plus tard le 7^e jour (Fassbender et al., 1994). Les concentrations élevées d'IL-6 présentaient une corrélation positive significative avec le volume de la lésion cérébrale à la tomодensitométrie et avec des résultats fonctionnels et neurologiques médiocres. Divers autres rapports ont fait état de concentrations plasmatiques élevées d'IL-6 chez des patients ayant subi un AVC aigu (Beamer et al., 1995; Carlstedt et al., 1997; Fassbender et al., 1997; Ferrarese et al., 1999; Kim et al., 1996; Tarkowski et al., 1995a; Vila et al., 2000a; Vila et al., 2000b).

Récemment, Perini et ses collaborateurs (2001) ont confirmé la présence de taux sériques accrus d'IL-6 chez des patients présentant un AVC aigu, le maximum étant atteint le 3^e jour. Lors d'études antérieures, une élévation des taux sériques d'IL-6 avait été observée après huit heures et avait duré jusqu'au 19^e jour (Fassbender et al., 1994; Ferrarese et al., 1999; Kim et al., 1996a; Tarkowski et al., 1995a). Les faibles taux constatés, au départ, et après un jour, chez des patients participant à l'étude de Perini et al. (2001), pourraient être dus à l'application de critères d'exclusion plus stricts. Des études antérieures (Fassbender et al., 1994; Tarkowski et al., 1995a), visaient à trouver un «prédicteur précoce» de lésions tissulaires afin de bien estimer le rapport risques-avantages justifiant un traitement de la phase aiguë en quelques heures.

Des globules blancs sanguins stimulés provenant de patients ayant fait un AVC présentent une augmentation importante de la libération d'IL-6 dès le 1^{er} ou le 2^e jour, et jusqu'à un mois après l'AVC (Ferrarese et al., 1999). Les concentrations d'IL-6 dans le

LCR sont nettement plus fortes que ses concentrations sériques. Elles ont atteint leur maximum les jours deux et trois, et les concentrations initiales d'IL-6 dans le LCR présentaient une corrélation significative avec le volume de l'infarctus mesuré par fMRI après deux à trois mois (Tarkowski et al., 1995a). Erren et ses collaborateurs, ont suggéré que l'élévation des taux d'IL-6 circulante constituait un signe inflammatoire d'une athérosclérose avancée. Par ailleurs, l'IL-6 pourrait produire des effets anti-inflammatoires (Tilg et al., 1994) et neuroprotecteurs (Loddick et al., 1998) dans certaines circonstances. Tilg et ses collaborateurs (1994), afin de démontrer les propriétés anti-inflammatoires de l'IL-6, ont observé que l'administration d'un recombinant de IL-6 augmentait les concentrations plasmatiques de l'IL-1ra et des récepteurs solubles p55 du TNF (TNFsRp55), chez les patients atteints de cancer. D'autres chercheurs ont démontré aussi les propriétés anti-inflammatoires de l'IL-6 (Aderka et al., 1989; Barton et Jackson, 1993; Schindler et al., 1990; Ulich et al., 1991). De plus, Loddick et ses collaborateurs ont démontré lors d'une série d'expérimentation que l'injection intracérébroventriculaire d'un recombinant de l'IL-6 diminuait la taille de la lésion ischémique, suggérant ainsi que l'IL-6 possède des propriétés endogènes inhibitrices de la mort neuronale durant une ischémie cérébrale.

6.3.4. Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α)

L'induction de l'ARNm du TNF- α dans le cortex ischémique et la présence de la protéine TNF- α neuronale ont été mises en évidence après l'occlusion permanente de l'ACM chez le rat (Buttini et al., 1996; Liu et al., 1994). De plus, l'induction de l'ARNm du TNF- α dans le cortex ischémique, a été démontrée après l'occlusion temporaire de l'ACM chez le rat (Wang et al., 1994). Par ailleurs, les lésions ischémiques cérébrales focales sont réduites par l'inhibition de l'activité du TNF- α au moyen du récepteur soluble du TNF (sTNF-R) (Barone et al., 1997; Dawson et al., 1996) ou d'un anticorps monoclonal anti-TNF- α (Barone et al., 1997), tandis qu'elles sont exacerbées par l'administration de TNF- α (Barone et al., 1997). L'autopsie de patients ayant fait un infarctus cérébral aigu montre la régulation positive du TNF- α dans le tissu cérébral (Tomimoto et al., 1996); ce phénomène apparaît consécutivement dans la zone centrale et la zone périphérique de l'infarctus, avant l'expression du TNF- α dans l'hémisphère contralatéral et les zones cérébrales éloignées de l'infarctus (Sairanen et al., 2001). Chez les humains subissant un

AVC ischémique aigu, les concentrations de TNF- α sont élevées dans le LCR (Vila et al., 2000a; Zaremba et al., 2001), y compris chez ceux qui présentent des lésions prononcées dans la substance blanche (Tarkowski et al., 1997). Les concentrations sériques de TNF- α étaient élevées dans la plupart des études sur des patients atteints d'un AVC ischémique aigu (Carlstedt et al., 1997; Intiso et al., 1997; Vila et al., 2000a; Zaremba et al., 2001). Chez les patients présentant un infarctus lacunaire, les concentrations plasmatiques élevées de TNF- α sont associées à une détérioration neurologique précoce et à une évolution fonctionnelle défavorable (Castellanos et al., 2002). Il y a cependant une étude dans laquelle aucune augmentation des concentrations sériques de TNF- α n'a été observée (Fassbender et al., 1994).

L'injection intracérébroventriculaire de TNF- α , 24 heures avant l'occlusion de l'ACM, a augmenté nettement la taille de l'infarctus et cet effet pouvait être annulé par l'application d'anticorps anti-TNF- α (Arvin et al., 1996; Barone et al., 1997). Ces données portent à penser que le TNF- α pourrait peut-être préparer le cerveau à des lésions subséquentes, en activant l'endothélium capillaire, ce qui le rendrait pro-adhésif. De plus, le TNF- α peut induire l'apoptose d'une variété de cellules cibles (Fehsel et al., 1991; Selmaj et al., 1990; Zhang et al., 1995). Comme le TNF- α est abondant dans les lésions cérébrales ischémiques débutantes et tardives, il est possible que l'apoptose neuronale décrite dans le chapitre 3, soit déclenchée en partie par des cytokines produites localement.

Par contre, selon des données *in vitro*, le TNF- α pourrait aussi protéger les neurones contre les agressions métaboliques et excitotoxiques (Cheng et al., 1994). Le rôle neuroprotecteur du TNF- α dans l'ischémie cérébrale est aussi appuyé par le fait que des souris génétiquement déficientes en récepteurs du TNF- α ont présenté des infarctus plus volumineux (Bruce et al., 1996).

6.3.5. Hypoxie et cytokines

Une hypoxie locale est très courante à différents degrés (Moulder et Rockwell, 1987) et cette situation contrôle peut-être la libération des cytokines physiologiquement pertinentes, selon le contexte. Par conséquent, un changement microenvironnemental d'une cytokine donnée pourrait intervenir dans le contrôle des lymphocytes T et la prolifération d'autres types de cellules. Quand les cellules sont hypoxiques, on constate une accumulation des cellules en phase G1 du cycle de croissance cellulaire (Amellem et

Pettersen, 1993; Graeber et al., 1994; Taylor et Hodson, 1984); cette phase est habituellement inversement proportionnelle au taux de croissance cellulaire. Naldini et ses collaborateurs ont démontré que l'hypoxie influençait sur les activités antivirale (Naldini et al., 1993) et antiproliférative de l'IFN (Naldini et al., 1995) et sur la cytotoxicité du TNF (Naldini et al., 1994). Tous ces effets peuvent être reliés à la présence d'oxygène et à la sensibilité de divers types de cellules à l'IFN ou au TNF (Aune et Pogue, 1989).

Dans des études *in vitro* avec des cellules mononucléées du sang périphérique humain, l'hypoxie a influencé différemment la production des cytokines selon leur nature stimulatrice ou inhibitrice (Naldini et al., 1997). En effet, la libération d'IL-2, d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-6 (connues pour leurs activités stimulatrices sur la prolifération et la différenciation de cellules immunocompétentes) était nettement plus élevée que chez les témoins après 16 heures, tandis que celle d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) était nettement inhibée. Les travaux d'un autre groupe montrent que l'hypoxie déclenche la production d'IL-1 dans les cellules endothéliales humaines en culture, ce qui causerait la régulation positive des molécules d'adhérence des leucocytes par un mécanisme autocrine (Shreeniwas et al., 1992).

6.3.6. Autres marqueurs périphériques de l'inflammation post-ischémique

Un AVC ischémique donne lieu à une augmentation de marqueurs périphériques de la réponse inflammatoire, y compris la protéine C réactive (Muir et al., 1999; Syrjänen et al., 1989; Vila et al., 1999), la vitesse de sédimentation (Chamorro et al., 1995; Vila et al., 1999), le nombre total de leucocytes périphériques (Pozzilli et al., 1985), le nombre de neutrophiles périphériques (Vila et al., 1999) et la température corporelle (Boysen et Christensen, 2001). Une augmentation de ces marqueurs périphériques de l'inflammation et de la réponse inflammatoire en phase aiguë semble annoncer une évolution défavorable de l'AVC (Azzimondi et al., 1995; Chamorro et al., 1995; Di Napoli et al., 2002; Muir et al., 1999; Vila et al., 1999).

6.4. Conclusion

L'AVC induit un processus inflammatoire qui inclut l'activation de cellules locales et le recrutement de cellules de la périphérie. Les cellules du SNC tels la microglie, les cellules endothéliales et les neurones produisent des cytokines ayant des propriétés pro- ou anti-inflammatoires. Il est de plus reconnu que l'ischémie donne lieu à une réponse

inflammatoire par l'infiltration des PMN, des monocytes/macrophages et des lymphocytes T au niveau du SNC. Nous avons montré aussi que les cytokines pouvaient intervenir dans la médiation de la neurotoxicité qui suit un AVC. L'inflammation est reconnue comme un élément-clé dans la pathogénèse et le pronostic d'un AVC. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la réponse inflammatoire pourrait avoir une implication importante dans la thérapie appliquée aux patients avec AVC.

CHAPITRE 7

INTERACTIONS NEUROIMMUNES ET ASYMÉTRIE FONCTIONNELLE APRÈS ISCHÉMIE CÉRÉBRALE AIGUË

7.1. Communication bidirectionnelle entre le SNC et le système immunitaire

Plusieurs voies de communication bidirectionnelles et plusieurs interactions fonctionnelles ont été décrites entre le SNC et le système immunitaire (Ader et al., 1990; Downing et Miyan., 2000). En 1919, Ishigami a démontré une réduction de l'activité phagocytaire chez des patients tuberculeux pendant des épisodes de stress émotionnel. L'influence du SNC sur le système immunitaire a été proposée après que la vulnérabilité aux maladies en période de stress psychique eut été remarquée (Ader et al., 1996; Blalock, 1994). Un réseau de connections, par le biais de voies nerveuses, de cascades hormonales et d'interactions cellulaires, permet au SNC de réguler le système immunitaire à l'échelle locale (au foyer de l'inflammation), régionale (dans les organes immunitaires) et générale (par des voies hormonales).

À son tour, par des connections similaires, le système immunitaire régule aussi le SNC. Ces deux systèmes sont capables de répondre à un nombre infini de stimuli externes ou internes et de présenter, par la suite, un comportement d'adaptation basé sur la mémoire et l'expérience. Le fait que les lymphocytes soient capables de sécréter des substances solubles comme des hormones peptidiques (Weigent et Blalock, 1987) qu'on croyait être sécrétées uniquement par le SNC et le fait que les cellules gliales synthétisent des cytokines immunorégulatrices (Fontana et al., 1982), comme l'IL-1, indiquent que l'interrelation entre le système immunitaire et le cerveau est sans doute plus que conceptuelle. Durant l'inflammation, les cytokines produites au foyer de l'inflammation peuvent envoyer des signaux au cerveau et entraîner des symptômes non spécifiques tels la fièvre et le comportement de maladie, etc. (Banks et al., 1991; Straub et al., 1998). En outre, les cytokines sont exprimées dans des zones du cerveau, par exemple par la glie, les neurones et les macrophages comme on l'a déjà mentionné et jouent un rôle dans la mort des neurones (Gutierrez et al., 1993; Maier et al., 1998) aussi bien que dans leur survie (Kohm et al., 2000).

Le SNC régule le système immunitaire par deux grands mécanismes : (a) la réponse hormonale au stress et la synthèse de glucocorticoïdes, et (b) le système nerveux autonome par la libération de noradrénaline. Le SNC peut aussi réguler le système immunitaire localement, par l'intermédiaire des nerfs périphériques, par la libération de neuropeptides tels que la substance P et par la sécrétion de corticotrophine (CRH) (Kasprowicz et al., 2000; Melmon et al., 1974). Le système immunitaire est ensuite soumis aux influences neuroendocriniennes (Ader et al., 1996). Réciproquement, les infections ou les maladies inflammatoires de même que les agressions immunologiques influencent la transmission monoaminergique cérébrale et l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HHS) (Barneoud et al., 1988; Besedovsky et al., 1975; Besedovsky et al., 1977; Dunn et al., 1989; Masek et al., 1982; Sarlis et al., 1992). La figure 15 de Khom et ses collaborateurs (2000) illustre les voies de communication entre le SNC et le système immunitaire.

7.1.1. Rôle des hormones dans la réponse neuroimmune

Plusieurs études ont démontré les effets que le système hormonal produit par l'intermédiaire des glucocorticoïdes sur de nombreux aspects du fonctionnement des cellules immunitaires (Adcock et Ito, 2000; Barnes et Adcock, 1998). Jusqu'à récemment, on ne comprenait néanmoins pas bien que les glucocorticoïdes jouent un rôle physiologique essentiel dans la régulation du système immunitaire en présence ou en l'absence de maladies. Le principal mécanisme de régulation de l'effet des glucocorticoïdes sur le système immunitaire est l'axe HHS (figure 15). Les principales composantes de cet axe sont le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, le lobe antérieur de l'hypophyse située à la base du cerveau et les surrénales. La CRH est sécrétée par le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, gagne le lobe antérieur de l'hypophyse par la circulation porte hypophysaire et stimule la sécrétion d'ACTH. Cette dernière circule ensuite jusqu'aux surrénales où elle déclenche la sécrétion et la libération de glucocorticoïdes. L'axe HHS est soumis à la régulation du SNC et de la périphérie. Il peut aussi être modulé par d'autres facteurs, comme le système nerveux sympathique, les cytokines et d'autres neuropeptides, tels que l'arginine-vasopressine (AVP) (Scott et Dinan, 1998). La CRH est soumise à une régulation négative par l'ACTH, par elle-même et par d'autres neuropeptides et neurotransmetteurs dans le cerveau, tels que le système acide γ -aminobutyrique-benzodiazépines (GABA-BZP) et le système des peptides opioïdes.

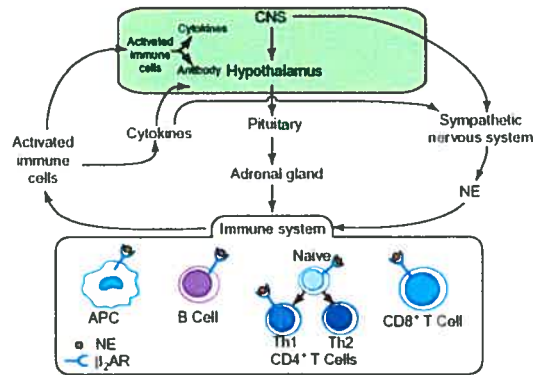


Figure 15. Diagramme schématisé des voies de communication entre le système nerveux central et le système immunitaire (Khom et al., 2000).

La CRH est régulée positivement par les systèmes sérotoninergique, cholinergique et histaminergique (Calogero et al., 1988). Une surstimulation de l'axe HHS accompagnée de quantités excessives de glucocorticoïdes circulants et d'une suppression globale des réponses immunitaires augmente la vulnérabilité aux infections, tandis qu'une sous-stimulation donne lieu à de faibles taux de glucocorticoïdes circulants et à une faible vulnérabilité à l'inflammation. Un dérèglement pourrait se produire à l'échelle moléculaire et entraînerait alors une résistance aux glucocorticoïdes et une augmentation de la vulnérabilité à l'inflammation. Les glucocorticoïdes jouent un rôle dans l'immunosuppression en réprimant le NF- κ B, un facteur nucléaire important qui intervient dans la régulation de cytokines et d'autres réponses immunitaires (Baldwin, 1996; Ghosh et al., 1998; McKay et Cidlowski, 1999).

7.1.2. Rôle du système nerveux autonome sympathique dans la communication bidirectionnelle entre le SNC et le système immunitaire

Il est généralement admis que des cellules immunitaires activées patrouillent normalement dans le SNC et que leurs produits exercent des effets protecteurs et des effets néfastes dans les pathologies du SNC. De même, bien que le médiateur chimique du système nerveux sympathique, la noradrénaline (NA), soit connu depuis longtemps pour sa contribution à la réponse de lutte ou de fuite, on sait maintenant qu'il stimule aussi les cellules immunitaires en présence d'une infection ou d'une agression immunitaire. Pour

que ce rôle soit rempli, les organes lymphoïdes contiennent beaucoup de fibres nerveuses sympathiques (Felten et al., 1987), qui commencent dans le SNC et se terminent à des terminaisons axonales, à des lieux de contacts similaires ou tout près de lymphocytes T ou B, ce qui permet à la NA d'influencer directement l'activité des lymphocytes (Straub et al., 1998).

Roszman et Brooks (1985) ont démontré qu'un traitement par la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) occasionne une déplétion de la NA dans le tronc cérébral et dans l'hypothalamus, sans que la concentration de sérotonine ne change, ni dans l'un, ni dans l'autre. La déplétion de la NA dans le SNC et les lésions hypothalamiques peuvent produire une altération notable de la fonction immunitaire. Ces observations, de même que la libération et dégradation ('turn over') de la NA dans l'hypothalamus peuvent dépendre de la réactivité immunitaire (Besedovsky et al., 1983).

Chez la souris, il a été prouvé que la stimulation du système immunitaire par des lipopolysaccharides (LPS) bactériens, le virus de la maladie de Newcastle (NDV) ou le virus de la grippe, augmente la libération de la NA et de la sérotonine (5HT) dans le cerveau et active la synthèse d'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et de corticostérone (Dunn et al., 1987; Dunn et al., 1989; Dunn et Welch, 1991; Rivier et al., 1989a). Ces réponses neurochimiques et endocriniennes se produisent rapidement quelques heures après l'administration des LPS bactériens et sont probablement médiées par les cytokines produites par les cellules immunitaires stimulées. Il a été démontré que l'IL-1, synthétisée par les macrophages activés (Oppenheim et al., 1979) est responsable de l'accroissement de la sécrétion d'ACTH qui suit l'administration de LPS ou du NDV (Besedovsky et Del Rey, 1989; Rivier et al., 1989a). De plus, l'administration directe d'IL-1 change les concentrations centrales de monoamines, effets qui ressemblent beaucoup à ceux qu'on constate après l'administration de LPS ou du NDV (Berkenbosch et al., 1987; Rivier et al., 1989b).

Des augmentations similaires mais retardées de la concentration de la NA et de la 5HT, de même qu'une stimulation de l'axe HHS, ont été observées après l'immunisation contre les globules rouges de mouton. Cette activation s'est produite au moment où la synthèse d'anticorps IgM était maximale, comme en témoignait le nombre de cellules formatrices de plages de lyse dans la rate (Besedovsky et al., 1975; Besedovsky et al., 1977; Besedovsky et al., 1983; Carlson et al. 1987). La présence de fibres nerveuses sympathiques dans les organes lymphoïdes et la libération de NA par les terminaisons

nerveuses situées tout près des cellules immunitaires constituent un mécanisme par lequel la NA pourrait influencer le fonctionnement des cellules immunitaires (Khom et al., 2000). À sa libération, la NA se lie aux récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 AR) exprimés à la surface de diverses cellules immunitaires et influence ainsi leur activité. L'activité des nerfs sympathiques qui commencent dans le SNC pourrait être influencée par les produits de cellules immunitaires activées, puisque les cytokines et les cellules circulantes sont transportées activement dans le SNC; de plus, la stimulation des récepteurs de cytokines exprimés sur les axones périphériques influence leur activité (Khom et al., 2000). Fait encore plus important, un petit nombre de lymphocytes patrouillent activement dans le SNC sain. Quand ils sont activés, un nombre accru de lymphocytes entrent dans le SNC et y produisent des cytokines et des anticorps susceptibles de le protéger contre des lésions ou, au contraire, de les exacerber. Enfin, la synthèse d'hormones déclenchée par l'activation de l'axe HHS pourrait également influencer diverses activités systémiques des cellules immunitaires (Khom et al., 2000).

Une infection, l'immunisation par des globules rouges de mouton et la présence de cytokines inflammatoires influencent toutes, tant l'activation du SNC, que la libération de NA dans les organes lymphoïdes. Plus particulièrement, l'IL-1 (Banks et al., 1991; Maier et al., 1998) et le TNF- α (Gutierrez et Banks, 1993) ont déjà été considérés comme les principaux signaux provenant de cellules immunitaires et capables de stimuler à la fois l'activation du SNC et la libération de NA. De données récentes ont cependant révélé que les lymphocytes B et les lymphocytes CD4⁺ spécifiques d'antigènes jouent un rôle crucial dans la stimulation lymphocytes T de la libération de NA dans la rate (Khom et al., 2000).

7.2. Latéralisation cérébrale et conséquence de l'AVC sur le système nerveux sympathique

La latéralisation ou l'asymétrie fonctionnelle du cerveau est bien connue chez l'humain et les animaux (Glick et al., 1977; Glick et al., 1979; Geschwind et Galaburda, 1982). Des études fonctionnelles, anatomiques et neurochimiques ont toutes démontré que les hémisphères droit et gauche n'ont pas les mêmes fonctions (Geschwind et Galaburda, 1985a; Geschwind et Galaburda, 1985b; Geschwind et Galaburda, 1985c). La parole et la prédominance gestuelle dépendent de l'hémisphère dominant, tandis que la représentation de l'espace, l'affect et la mélodie sont des propriétés situées dans l'hémisphère mineur ou

non-dominant (Heilman et Valenstein, 1993). Ce ne sont là que quelques exemples de latéralisation cérébrale.

De plus en plus de données récentes portent à penser que les efférences autonomes cérébrales sont aussi latéralisées. Chez le rat, les infarctus de l'hémisphère droit ont plus de conséquences sur le système nerveux sympathique que ceux de l'hémisphère gauche, y compris des changements de la tension artérielle moyenne, des décharges neuronales sympathiques rénales, des électrocardiogrammes et des taux plasmatiques de NA (Hachinski et al., 1992). De même, chez des patients présentant un AVC aigu, la perturbation du contrôle de la fonction autonome cardiaque dépend de l'hémisphère atteint, avec une prédominance sympathique dans les AVC de l'hémisphère droit (Robinson et al., 1997).

Une étude a été effectuée pour évaluer le dysfonctionnement autonome cardiaque de patients présentant un infarctus ischémique au niveau du cortex insulaire ou ailleurs dans le cortex et pour démontrer une latéralisation de l'activité autonome médiée par le cortex insulaire (Meyer et al., 2004). La fonction sympathique a été évaluée de manière prospective, en déterminant les taux plasmatiques de noradrénaline et d'adrénaline chez 15 patients atteints d'un AVC au niveau de l'ACM de l'hémisphère gauche (quatre infarctus insulaires) et 14 patients ayant subi un AVC au niveau de l'ACM de l'hémisphère droit (cinq infarctus insulaires). Les tensions artérielles systolique et diastolique ainsi que la fréquence cardiaque ont été enregistrées pendant les cinq premiers jours suivant l'AVC. L'activité sympathique était significativement plus élevée dans les cas d'infarctus insulaire que dans les autres ($p < 0,05$). Les paramètres cardiovasculaires étaient également élevés chez les premiers. L'activation pathologique du système nerveux sympathique était plus importante après un AVC au niveau du cortex insulaire de l'hémisphère droit ($p < 0,05$). Les patients présentant un AVC dans le cortex insulaire de l'hémisphère droit sont donc les plus susceptibles de connaître un dysfonctionnement autonome cardiaque.

7.3. Latéralisation cérébrale, préférence manuelle et immunité

Une relation entre la latéralisation cérébrale et la fonction immunitaire a été suggérée par Geschwind et ses collaborateurs (Geschwind et Galaburda., 1985a; Geschwind et Galaburda 1985b; Geschwind et Galaburda 1985c; Geschwind et Behan, 1982). Ils ont observé une fréquence plus élevée de gauchers chez les patients atteints d'une maladie immunitaire (Geschwind et Behan, 1982). D'autres études ont donné des résultats

contradictoires concernant la relation entre les maladies auto-immunes et la manualité gauche (Pennington et al., 1987; Satz et Soper, 1986; Searleman et al., 1987; Van Strien et al., 1987). Cependant, quelques études viennent appuyer l'existence d'une association entre la latéralisation cérébrale et la fonction immunitaire. Des différences d'activité des cellules NK ont été constatées chez des femmes, en fonction de l'asymétrie de l'activation EEG frontale (Kang et al., 1991). Chez 25 patients âgés, droitiers, ayant récemment subi un AVC, un patient ayant eu un AVC du côté droit et six patients ayant eu un AVC du côté gauche, ont présenté une réduction fonctionnelle immunologique et une infection grave (Kawaharada et Urasawa, 1992).

Une étude réunissant 176 adultes et enfants a montré des différences de réactions cutanées à l'histamine, entre le bras gauche et le bras droit selon la latéralité manuelle personnelle et familiale (Wise et al., 1993). Le diamètre de la papule causée par l'histamine était plus grand sur le bras gauche des droitiers dont tous les parents proches étaient droitiers, égal sur les bras gauche et droit des droitiers ayant des parents proches non droitiers et plus grand sur le bras droit des gauchers. Étant donné que l'histamine est le médiateur commun final pour les réactions d'hypersensibilité immédiate, ces résultats appuient une relation entre l'asymétrie cérébrale et celle du système immunitaire.

7.4. Lésions corticales et latéralisation de la réponse immune chez les animaux

Des études animales indiquent que le néocortex intervient dans la modulation de la fonction immunitaire (Ader et al., 1996; Blalock, 1994) et que les effets modulateurs des hémisphères droit et gauche sont différents (Neveu, 1988; Neveu, 1992; Neveu et al., 1994; Renoux, 1988).

Un contrôle néocortical latéralisé du nombre et de la fonction des lymphocytes T, mais non des lymphocytes B, a été démontré (Bardos et al., 1981; Biziere et al., 1985; Bizière et Renoux, 1986; Renoux et al., 1980; Renoux et al., 1983b). Des résultats récents ont également établi que le néocortex influence les activités immunostimulatrices de l'imuthiol (Renoux et al., 1984; Renoux et al. 1987). Le néocortex est donc probablement le grand organisateur de diversité, qui module le nombre et l'activité des cellules immunocompétentes et qui dirige chaque composante du système immunitaire, pour qu'elle joue son rôle adéquatement. Pour créer un effet de latéralisation du système immunitaire chez des souris, elles ont été soumises à des lésions au niveau des faces dorsale et latérale des structures corticales fronto-pariétales, sans pénétrer dans le corps calleux (Biziere et al.,

1985; Renoux et al., 1983a). Ces chercheurs ont constaté que l'ablation partielle du néocortex droit augmentait significativement le poids du thymus par rapport aux témoins (Renoux et al., 1980; Renoux et al., 1983a; Renoux et al., 1984). Le poids de la rate et celui du thymus étaient réduits chez les souris lésées du côté gauche et associés à des changements d'architecture thymique (Biziere, 1985). En outre, le nombre de lymphocytes T était réduit chez les souris porteuses d'une lésion corticale gauche, jusqu'à environ 50 % de celui des souris témoins ou lésées du côté droit, tandis que le nombre de lymphocytes B spléniques était similaire chez les souris lésées et les souris intactes (Renoux et al., 1980; Renoux et al., 1983b; Renoux et al., 1984). Simultanément, les lésions du néocortex gauche réduisaient l'activité du facteur sérique qui induisait la maturation des cellules précurseurs, alors que les lésions du néocortex droit l'augmentaient (Renoux et al., 1983a).

L'influence du néocortex sur les lymphocytes T s'étend à leurs capacités fonctionnelles. Une lésion corticale gauche réduisait la capacité des cellules spléniques à être stimulées par les mitogènes des lymphocytes T et diminuait le nombre d'IgG anti-GRM (globules rouges de mouton) déterminé par la technique des plages de lyse, sans modifier les réponses qui dépendaient des lymphocytes B. En revanche, la lymphoprolifération induite par la PHA ou la concanavaline A (Con A) et le nombre d'IgG anti-GRM déterminé par la technique des plages de lyse étaient augmentés dans les cellules spléniques des souris lésées du côté droit, par rapport aux souris témoins, changements bien supérieurs chez les souris lésées du côté droit que chez les souris lésées du côté gauche, alors que les réponses dépendant des lymphocytes B n'étaient pas changées (Renoux et al., 1980; Renoux et al., 1983b; Renoux et al., 1984). Les lésions du néocortex gauche inhibent l'activité des cellules NK sans changer la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) pour les globules rouges de poulet (Bardos et al. 1981), ce qui porte à croire que cette activité cytotoxique dépendant des macrophages n'est pas contrôlée par le néocortex fronto-pariétal. Lésion du néocortex influence également la réponse d'une culture mixte de lymphocytes. L'activation, par des allo-antigènes, des cellules spléniques des souris lésées à gauche, est retardée par rapport à celle des témoins, tandis que la réponse d'une culture mixte de lymphocytes spléniques de souris lésées à droite est maximale, une fois que les cellules témoins ne répondent plus (Renoux et al., 1983b). Une lésion néocorticale droite augmente la quantité d'antigènes de classe I et II du CMH exprimés sur les lymphocytes T (Renoux et al., 1987). Finalement, l'emploi d'imuthiol, qui recrute et active les lymphocytes T et régule leur nombre et les activités qui en dépendent, a été

étudié (Renoux et al., 1984; Renoux et Renoux., 1979). Chez des animaux au néocortex gauche lésé, l'imuthiol a normalisé ou même augmenté encore plus le nombre et la réponse des lymphocytes T. L'imuthiol n'a pas influencé la lignée lymphocytaire T chez les souris au néocortex droit lésé, quoique chez ces animaux, les activités des lymphocytes T soient toujours augmentées sans traitement.

Des études menées chez les rats (Barneoud et al., 1988b; La Hoste et al., 1989) ont démontré également que les lésions du néocortex gauche réduisent l'immunité liée aux lymphocytes T, alors que les lésions du côté droit la rehaussent.

7.5. Lésions corticales et latéralisation de la réponse neuroimmune systémique chez les humains

Chez l'humain, une étude a examiné les différences d'effets immunologiques de résections cérébrales, du côté dominant ou mineur, chez 11 patients adultes nécessitant une opération pour épilepsie (Meador et al., 1999). Le nombre absolu de lymphocytes, le nombre total de lymphocytes T, le nombre de lymphocytes T auxiliaires CD4+ et le nombre de lymphocytes T suppresseurs CD8+, étaient tous réduits après une résection dans l'hémisphère dominant, mais ils étaient augmentés après une résection dans l'hémisphère non-dominant. Ces constatations réunies donnent à penser que le cortex cérébral influence le système immunitaire périphérique et que cette influence est latéralisée.

7.6. Impact des lésions sous-corticales du cerveau sur la réponse immune chez les animaux

Roszman et ses collaborateurs (1985a) ont entrepris une série d'expériences visant à explorer les conséquences immunologiques de lésions destructrices de certaines zones du cerveau. Les lésions électrolytiques au niveau de la partie antérieure de l'hypothalamus (AH) de rats Fischer-344 ont supprimé divers paramètres immunitaires (Cross et al., 1980; Roszman et al., 1985b), tandis que les lésions de l'hippocampe (HC), de l'amygdale (AM) et des corps mamillaires étaient stimulatrices comparativement aux lésions du cortex frontal et aux animaux sains (Brooks et al., 1982; Roszman et al., 1985b) (pour plus de détails, voir le Tableau IV). Ces altérations du nombre et de la réactivité des lymphocytes et de l'activité des cellules NK (Cross et al., 1984) ont été de courte durée. En effet, l'effet maximal a été observé quatre jours après la formation des lésions et tous les paramètres se sont normalisés en moins de trois semaines. Même si la plasticité des neurones et/ou des neurotransmetteurs à l'échelon moléculaire pourrait expliquer les effets aigus et la

récupération observée, la suppression immunologique pourrait aussi résulter du stress causé par la création des lésions. Étant donné, cependant, que les concentrations sériques de corticostérone ne différaient pas entre les animaux expérimentaux et les animaux témoins, les modifications du nombre de lymphocytes et de leur réactivité aux mitogènes et/ou aux antigènes n'étaient pas simplement des modifications causées par les corticostéroïdes (Cross et al., 1980). Ces résultats renforcent le concept de neuro-immunomodulation et corroborent l'hypothèse suivant laquelle le SNC peut aussi bien inhiber que stimuler la réactivité immunitaire.

Tableau IV. Effet de lésions électrolytiques bilatérales sur les paramètres immunitaires (selon Roszman et al., 1985b)

	Partie antérieure de l'hypothalamus	Hippocampe ou amygdale
Nombre de cellules spléniques	Diminution	Absence de changement
Nombre de thymocytes	Diminution	Absence de changement ou augmentation (HC)
Réactivité des cellules spléniques aux mitogènes	Diminution	Augmentation
Réactivité des thymocytes aux mitogènes	Absence de changement	Augmentation
Réactivité aux antigènes	Diminution	Non déterminée
Activité des cellules NK	Diminution	Non déterminée
Activité des cellules suppressives macrophages	Augmentation	Diminution

7.7. Latéralisation de la réponse immune chez les patients avec un AVC

Certaines constatations cliniques permettent de supposer l'existence d'une latéralisation cérébrale de l'immunomodulation après un AVC. Chez 25 patients droitiers, âgés, en phase aiguë d'AVC (11 AVC droits, 14 AVC gauches), une réduction du nombre de lymphocytes circulants et de leurs fonctions, ainsi qu'une augmentation de l'incidence d'infections graves étaient nettement plus fréquentes quand l'AVC se situait dans l'hémisphère gauche (Kawaharada et Urasawa, 1992). Une latéralisation des réponses inflammatoires cutanées médiées par les lymphocytes T a également été retrouvée chez des patients ayant eu un AVC (Tarkowski et al., 1991; Tarkowski et al., 1995b).

Des données préliminaires de Saint-Marseille et ses collaborateurs, sur 15 hommes âgés (5 AVC droits, 5 AVC gauches et 5 témoins sains appariés) ont indiqué 56 % d'inhibition de la réponse proliférative *in vitro* des lymphocytes T du sang périphérique à la phytohémagglutinine A (PHA) dans les cas d'AVC gauche et une absence de différence dans les cas d'AVC droit. L'inhibition de la réponse des lymphocytes T aux mitogènes s'est maintenue dans les cas d'AVC gauche pendant toute la période d'examen, d'une durée de trois semaines, commençant pas moins de 15 jours après le début de l'ischémie. Pour cette étude, seuls des sujets ayant des lésions néocorticales unilatérales après un AVC thrombotique ont été recrutés. Les lésions étaient objectivées par l'échographie Doppler et la tomодensitométrie. Les lésions sous-corticales et bilatérales étaient exclues (Saint-Marseille et al., 1996).

7.8. Conclusion

Le système immunitaire et le SNC ont des similitudes frappantes. Les deux systèmes présentent une diversité cellulaire remarquable; les deux possèdent des caractéristiques mnésiques qui n'existent pas dans d'autres systèmes. Les deux visent à reconnaître des substances étrangères et à réagir pour maintenir les caractéristiques de l'espèce et de l'individu. L'apprentissage entre cellules dans les deux systèmes et la communication entre le cerveau et le reste du corps met en jeu un réseau complexe dans lequel des messages sont transmis et reçus (Pert et al., 1985).

Les influx nerveux envoyés par le néocortex au moyen des neurotransmetteurs, des hormones et des catécholamines constituent l'arc efférent du réseau qui participe à la différenciation des cellules lymphoïdes. Les lymphocytes et les macrophages activés par des antigènes informent le SNC de la présence d'un intrus, en produisant des neuropeptides et des catécholamines. Ainsi donc, les cellules immunitaires influencent la sécrétion cérébrale de neurotransmetteurs qui, à leur tour, modifient le fonctionnement du système immunitaire en réponse à un élément étranger.

Le système nerveux autonome, en particulier le système nerveux sympathique et son médiateur la NA, servent de relais au cerveau pour réguler l'immunité et l'inflammation en périphérie. Or, certaines observations suggèrent que l'AVC entraîne des dysfonctionnements asymétriques du système nerveux autonome, dans le sens où ces dysfonctionnements dépendent de l'hémisphère cérébral lésé. De plus, la localisation spécifique des lésions cérébrales (cortex versus sous-cortex) peut influencer les

conséquences immunologiques en périphérie, allant de l'immunosuppression à l'immunostimulation. Cependant les modèles utilisés jusqu'à présent sont très artificiels et restent en majorité éloignés de la physiopathologie de l'AVC. Il devient donc important de savoir si les lésions cérébrales unilatérales induites dans les modèles bien établis d'AVC entraînent des effets asymétriques sur le système nerveux sympathique et la réponse immunitaire en périphérie.

DEUXIÈME PARTIE
CONTRIBUTION ORIGINALE

BUT ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) restent une cause majeure de mortalité et d'incapacité physique permanente, essentiellement parce qu'on n'a pas complètement élucidé les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les lésions cérébrales primaires et secondaires. L'AVC ischémique est le type le plus fréquent. Il est causé généralement par l'occlusion d'une artère cérébrale majeure par un thrombus ou un embolie, entraînant la réduction ou la perte de l'irrigation sanguine d'une partie du cerveau et une cascade d'événements complexes aboutissant à la mort des neurones cérébraux. L'hypoxémie et l'inflammation systémique sont des complications importantes de l'AVC ischémique. Ces complications peuvent avoir un impact sur les lésions cérébrales et elles représentent des cibles thérapeutiques potentielles. Le but de ce travail est de mieux caractériser l'hypoxémie et l'inflammation systémique induites par l'AVC ischémique et d'évaluer si ces phénomènes sont soumis à l'asymétrie cérébrale, comme c'est le cas de plusieurs conséquences de l'AVC. Les objectifs spécifiques sont les suivants : (i) Évaluer les modifications des gaz sanguins, l'érythropoïétine (EPO) plasmatique, le compte des globules rouges, l'hématocrite et les globules blancs sanguins dans le modèle animal bien établi d'occlusion de l'ACM chez le rat ; (ii) Déterminer la cinétique d'induction des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α dans le sang et la rate après occlusion de l'ACM; (iii) Comparer les effets de l'occlusion unilatérale de l'ACM gauche ou droite sur les globules rouges et les globules blancs sanguins, ainsi que sur le nombre et la fonction des globules blancs spléniques.

Les travaux permettant d'atteindre ces objectifs sont décrits dans les trois publications originales qui suivent. De plus, la section consacrée à la discussion générale intègre l'ensemble de nos résultats, identifie les limites de ce travail et définit quelques unes des perspectives futures.

**TRANSIENT MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION
INFLUENCE ON SYSTEMIC OXYGEN HOMEOSTASIS
AND ERYTHROPOIESIS IN WISTAR RATS**

Contribution des auteurs à l'article

Tous les auteurs de ce papier ont apporté une contribution significative au niveau intellectuel. Tous ont révisé le projet et ont contribué à l'évaluation du modèle ainsi qu'aux méthodes d'analyses.

Alain Gendron: Étudiant gradué au doctorat en pharmacologie a contribué à 70% des expériences et à la rédaction du manuscrit.

Les docteurs Edouard Kouassi, Patrick du Souich et Jeanne Teitelbaum sont co-superviseurs de l'étudiant gradué. Ils furent responsables de l'élaboration du projet. Le Dr Kouassi, directeur de l'étudiant gradué, fut responsable de l'aspect immunologique, le Dr du Souich, de l'aspect pharmacologique et le Dr Teitelbaum de la composante neurologique de l'étude.

Stephen Nuara a contribué à 10% de l'expérimentation. Il a participé à l'élaboration et du modèle animal et fut impliqué dans la validation des essais cliniques chez les rats après AVC.

Chantal Cossette a contribué à 20% de l'expérimentation et à contribué à l'élaboration du projet de recherche.

David Geadah a contribué à l'élaboration du projet.

Giovanni D'Angelo est un expert en hématologie et a joué un rôle important dans l'interprétation des données hématologiques.

CHAPITRE 8

MANUSCRIT I

**TRANSIENT MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION
INFLUENCE ON SYSTEMIC OXYGEN HOMEOSTASIS
AND ERYTHROPOIESIS IN WISTAR RATS**

Stroke. 2004;35:1979-1984

Alain Gendron, MSc, DESS; Edouard Kouassi, PhD; Stephen Nuara, DEC; Chantal Cossette, DEC; Giovanni D'Angelo, BSc, FCMLS; David Geadah, MSc; Patrick du Souich, MD, PhD; Jeanne Susan Teitelbaum, MD

From the Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada (A.G., E.K., S.N., C.C., G.D., D.G.); Department of Pharmacology (A.G., P.d.S.) and Department of Medicine (E.K.), University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada; and Montreal Neurological Hospital and McGill University, Montreal, Quebec, Canada (J.S.T.).

Correspondence to Jeanne Teitelbaum, MD, Montreal Neurological Hospital, 3801 University avenue, C/O Lucille Orchard, Montreal, Quebec, H3A-2B4. E-mail jteitelbaum@hotmail.com

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-67183) and from Fonds de la Recherche en Santé du Québec/AstraZeneca. We thank Sylvie Arbour for her assistance with laboratory measurements, and Sergio Escobedo for his assistance with statistical analyses. We thank Douglas Fish, MD, for his helpful comments and advice.

Influence of Transient Middle Cerebral Artery Occlusion on Systemic Oxygen Homeostasis and Erythropoiesis in Wistar Rats

Running Title: Stroke-Induced Increases in EPO and Erythrocytes

Key Words: hypoxia; erythropoietin; hematocrit; stroke

Background and Purpose – Systemic hypoxia is a common complication in stroke patients, and it may exacerbate ischemic brain damage. Expression of the hypoxia-inducible cytokine erythropoietin (EPO) is up regulated in the brain both in stroke patients and in animal stroke models, and exerts local neuroprotective effects in the ischemic brain. EPO is also well known to stimulate red blood cell (RBC) production. The purpose of the present study was to evaluate whether post-stroke systemic hypoxia is present in the rat model and is associated with increased peripheral EPO and RBC production.

Methods – Wistar rats underwent 1-hour transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) under mechanical ventilation, followed by reperfusion without further ventilation. Groups of MCAO and sham-operated animals were evaluated at extended times after reperfusion for assessment of arterial blood gases, plasma EPO, and complete blood count.

Results – Arterial oxygen saturation was significantly lower in the infarct group between 6-24 hours after reperfusion ($P=0.0005$), and plasma EPO levels were increased at 6 hours after reperfusion ($P<0.05$). RBC counts and hematocrit were transiently increased 2-7 days after reperfusion in animals with MCAO compared to sham. Maximal increases were seen at day 7 (22% and 16% increases of RBC count and hematocrit, respectively; $P<0.001$). In contrast, the white blood cell counts in animals with MCAO decreased by more than 30% in the same time period.

Conclusions – Plasma EPO levels, RBC counts and hematocrit are all increased in response to systemic hypoxia following cerebral ischemia in rats.

Clinical observations indicate that hypoxia is a common complication of stroke, in the acute phase and hours to days after stroke onset.^{1,2} Even in stroke patients who appear normoxic during the day, 25% develop hypoxia at night.³ Studies in rats using intraluminal filament transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) and graded levels of hypoxia have shown that hypoxia exacerbates ischemic brain damage.⁴ It is not known whether animals with MCAO spontaneously develop systemic hypoxia after a stroke, but this might be expected.

Erythropoietin (EPO) is a hypoxia-inducible cytokine, originally identified as a kidney-derived stimulator of erythroid progenitor cell proliferation and differentiation.^{5,6} Increased synthesis of EPO is known to stimulate the production of red blood cells (RBC), thereby increasing oxygen delivery to tissues as a mechanism of physiological adaptation to hypoxia.^{7,8} Recent studies have shown that EPO and its receptor (EPOR) are expressed in rodent and human brain tissues.^{9,10} Expression of the EPO system is up-regulated in the ischemic brain following MCAO in rodents,^{11,12} and in human autopsy brains with ischemic infarcts or general hypoxic damage.¹³ Neutralization of endogenous brain EPO by administration of soluble EPOR potentiates ischemic brain injury in a rodent MCAO stroke model,^{14,15} suggesting a role for the brain EPO system in neuroprotection against ischemic damage. Little is known about potential up-regulation of the levels of peripheral EPO and its erythropoietic activity in response to systemic hypoxia following cerebral ischemia. In MCAO mice, a transient increase of blood hematocrit was observed at the end of occlusion, with normalization 1 hour after reperfusion.¹⁶ A similar study showed increases in hematocrit 24 hours after reperfusion.¹⁷ Potential changes in blood hematocrit at later reperfusion time points, and their relationship with changes in blood gases and plasma EPO are not known. The purpose of the present study was to evaluate the changes in plasma EPO, RBC numbers and hematocrit from 0 to 28 days after transient MCAO in Wistar rats, and to examine whether these changes are associated with systemic hypoxia.

Materials and Methods

Animals

All procedures were carried out in accordance with current guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Adult male Wistar rats (Charles River Breeding Center, St. Constant, Quebec) were housed in groups of 3-5 and maintained under a natural light cycle of 14 h light/10 h dark, with food and water available ad libitum. Animals were fasted for 2 h before surgery and weighed prior to the surgery and at the moment of sacrifice. The animals' weights were uniform at the beginning of the experiments and ranged between 350-400 g.

Transient MCAO

The technique for transient MCAO was modified from Zhu and Auer,¹⁸ as described previously.¹⁹ Anesthesia was induced with 5% isoflurane inhalation and maintained with 1-2% isoflurane in nitrous oxide/oxygen (70%/30%). Animals were intubated and ventilated (Harvard model 683 rodent ventilator). Rectal temperature was maintained throughout surgery at 37 ± 0.5 °C with a heating blanket (Harvard Homeothermic Blanket Control unit). The tail artery was cannulated for blood sample collection, and blood pressure monitoring (Gould 13-6615-50 preamp and 6600 Amp amplifier, Graphtec Mark8 recorder). Blood gases and glucose level pre- and immediately post-ischemia were obtained. The total amount of blood removed never exceeded 400 μ l and was replaced with an equal volume of saline. Arterial blood gases (PaO₂, PaCO₂, SaO₂, pH) were measured using a blood gas analyzer (Radiometer ABL520, Copenhagen, Denmark). The animals' ventilatory rate was adjusted to maintain normal levels of oxygen and carbon dioxide. MCAO was induced with a 3-0 monofilament coated with poly-L-Lysine at a mean arterial blood pressure (MABP) of 60 mm Hg by regulating the percentage of isoflurane for a period of 60 min. The filament was then withdrawn to allow reperfusion, and discontinuing the isoflurane restored blood pressure. All wounds were closed, and the animals were allowed to recover in a room maintained at 21.6-21.8 °C. Sham-operated animals underwent the same surgical treatment without suture insertion or MABP reduction. In some experiments, a separate sham hypotensive group was also studied. This sham hypotensive group was identical to the normotensive one except for MABP, which was reduced to 60 mm Hg for 60 min after isolation of the internal carotid. All other physiological parameters were similar in MCAO, sham normotensive and sham hypotensive rats, both pre- and immediately post-surgery.

Manipulation of the carotid body was identical in all sham and ischemic groups. When follow-up periods exceeded 24 hours, a subcutaneous bolus of 10 ml 0.9% NaCl was given immediately post-surgery and daily for 2 days to prevent dehydration. Neurological assessment was performed in all rats before surgery, and at the moment of sacrifice, using clinical scales described elsewhere.¹⁹ There was a 30-40% decrease in sensory and motor activity in rats undergoing MCAO. No neurological abnormalities were observed in sham and sham hypotensive groups.

Experiment 1: Blood Gases, Plasma EPO, and Hematological Changes During the First 24 Hours After Reperfusion

A total of 4-5 animals in left sham-operated groups and 5-6 animals in left MCAO groups were killed at 8 different time intervals (0, 1, 2, 4, 6, 18, and 24 hours) after reperfusion. The animals were anesthetized and blood from the tail artery was used for measurement of blood gases, followed by cardiac puncture for measurement of EPO levels and complete blood count (CBC). Plasma EPO levels were measured by competitive radioimmunoassay using the EPO-Trac ¹²⁵I RIA kit (DiaSorin).²⁰ CBC was performed with a Coulter Counter analyzer, and WBC differential count was measured by light microscopy on peripheral blood smears stained with Wright-Giemsa.

Experiment 2: Hematological Changes from 0 to 28 Days After Reperfusion

MCAO was induced in the left or the right middle cerebral artery. Changes in hematological parameters were measured at 0, 2, 7, 14, and 28 days after reperfusion. A total of 10-15 animals in each of left or right sham-operated groups and 5-9 animals in each of left or right MCAO groups were killed at each time point. Blood was harvested by intra-cardiac puncture, CBC and WBC differential count were performed as above.

Statistical Analysis

After data validation and normality checks, the effects of the main factors were assessed by means of a mixed analysis of variance (ANOVA) model with a first order autoregressive covariance structure. Main treatment effects were calculated and plotted for each of the factors. Comparisons at specific time-points were analyzed using simple ANOVA for independent groups, and post-hoc analysis was done by the Wilcoxon rank-

sum test. Spearman coefficients (r) were used to assess the degree of correlation between the main factors. Statistical significance was reached if $P < 0.05$.

Results

Effect of MCAO on Blood Gases After Reperfusion

There was a precipitous drop in SaO₂ immediately following surgery in both MCAO and sham groups, as the animals were no longer oxygenated and ventilated (Figure 1). SaO₂ stabilized at about 85% in the sham animals at 6 hours after reperfusion, but continued to drop to 75–80% in the MCAO animals, with a significant difference between these groups at 24 hours ($P=0.03$). The average SaO₂ values for the period 0–4 hours after reperfusion were virtually identical in the 2 groups (Figure 2A : $94.3\pm 1.2\%$ versus $93.7\pm 1.8\%$ in sham and MCAO rats, respectively). Between 6–24 hours after reperfusion, average SaO₂ values were significantly lower in the MCAO rats, and were in the hypoxic range ($86\pm 0.8\%$ versus $78.8\pm 1.7\%$; $P=0.0005$) (Figure 2A). Changes in PaO₂ were similar to those of SaO₂, with no difference between MCAO and sham animals 0–4 hours after reperfusion, and significantly lower PaO₂ levels in MCAO rats between 6–24 hours after reperfusion (66.7 ± 1.4 mm Hg vs. 58.0 ± 2.0 mm Hg; $P<0.0013$) (Figure 2B). There was no significant difference in PaCO₂ values between sham and MCAO animals, although there was a trend for PaCO₂ from 6–24 hours after reperfusion to be higher in the MCAO group ($P=0.0551$; Figure 2C).

Effect of MCAO on Peripheral EPO Production and Hematological Parameters After Reperfusion

EPO concentrations were similar in both groups at time 0, and they increased gradually with time in both cases, followed by a decline towards baseline levels. Peak concentration of EPO was 20% higher in the MCAO animals (89.2 ± 8.9 mU/ml versus 74.4 ± 3.1 mU/ml, $P<0.05$, Figure 3), and occurred 2 hours later (6 versus 4 hours after reperfusion). As well, plasma EPO levels in MCAO rats tended to have a negative correlation with the SaO₂ values in these animals ($r=-0.62$; $P=0.056$). Changes in hematological parameters during the first 24 hours after reperfusion are summarized in Table 1, with no difference between groups, except a 26% decrease in WBC count at 24 hours in MCAO rats as compared to sham ($P<0.05$).

Effect of MCAO on Hematological Parameters from 0-28 Days After Reperfusion

CBC was performed on all animals at 0, 2, 7, 14 and 28 days after reperfusion. Data from left- and right-sided MCAO rats were pooled since no difference was observed between the sides of occlusion. RBC (Figure 4A) and hematocrit (Figure 4B) were unchanged in MCAO versus sham rats at the end of the surgical procedure (time 0). At day 2, the increases were significant in the stroke group: 12% ($P<0.01$) and 14% ($P<0.01$) for RBC and hematocrit, respectively. Maximal changes were observed at day 7, with a 22% increase for RBC ($P<0.001$), and a 16% increase for hematocrit ($P<0.001$). These parameters normalized 14 and 28 days after reperfusion. Changes in hemoglobin concentration in MCAO rats were similar to those of RBC count and hematocrit, with 10% ($P<0.01$) and 20% ($P<0.001$) increases at days 2 and 7, respectively, and no changes at days 14 and 28, as compared to sham. In contrast to the increases induced by MCAO in RBC variables, WBC count was decreased by 33% ($P<0.01$), 45% ($P<0.001$), and 38% ($P<0.01$) at 2, 7, and 14 days, respectively (Figure 4C). These changes in WBC count reflected as much the decrease within the MCAO group (27% decrease at day 7 compared to day 0) as the increase in counts in the sham group (58% increase at day 7 compared to day 0). The WBC counts were similar in both groups by day 28 (Figure 4C). Hematological parameters were assessed at days 0, 2 and 7 after surgery in the sham hypotensive group and compared to the sham normotensive group. MABP values in the hypotensive group were 22-25% lower than those in corresponding normotensive animals, and there was no difference in RBC count, hematocrit, and WBC count between these groups (Table 2).

Discussion

This study shows that MCAO rats develop moderate hypoxia ($\text{SaO}_2 \leq 80\%$; $\text{PaO}_2 \leq 60\%$) from 6 to 24 hours after reperfusion. The decreases in SaO_2 and PaO_2 in the ischemic animals are significant not only compared to sham controls, but because these values are now at levels that compromise oxygen delivery.²¹ The post-stroke systemic hypoxia in MCAO rats correlates well with previous clinical observations in stroke patients.^{1,3} Other studies using transient MCAO model in Wistar rats have found no difference in PaO_2 up to 4 hours after reperfusion,²² but no measurements were made after the 4-hour time frame.

In the ischemic brain, where autoregulation is often impaired, even low or moderate hypoxia can produce detrimental effects.^{23,24} The causes of post-stroke hypoxia may be multiple, including alterations in the central regulation of respiration, weakness of the respiratory muscles on the hemiplegic side, and obstructive sleep apnea.² Medical complications arising after a stroke such as aspiration, chest infection, and pulmonary emboli may also impair oxygenation.² In our model, hypoxia is not likely due to aspiration pneumonia or pulmonary embolism as the animals were not infected or immobile. The low PaO_2 associated with a slightly increased PaCO_2 point to a problem of ventilation, such as respiratory muscle weakness, central respiratory dysfunction or sleep apnea. It is also possible that MCAO animals had a greater respiratory depressant response to anesthesia because of progressive underlying brain damage. The immediate response to hypoxia involves reflex hyperventilation mediated by chemoreceptors in the carotid body.²⁵ Manipulation of the carotid body during surgery was identical in the sham and MCAO groups, thus eliminating damage to the chemoreceptors as a possible reason for the difference in PaO_2 between the two groups.

Hypoxia is the main stimulus of EPO production both in peripheral and brain tissues, by activation of a transcription factor, the hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α).^{6,7,26} A prolongation of the increase over time of plasma EPO is observed in the MCAO rats 6 hours after reperfusion, followed by moderate polycythemia 2-7 days after reperfusion. The fact that EPO levels increased only transiently in the presence of persistent hypoxemia is consistent with observations in other models,^{8,27,28} and this may be explained, at least in part, by cellular adaptation to hypoxia.^{8,28} The early time course of RBC increase is also consistent with the known effects of hypoxemia and EPO increase on erythropoiesis in rats.^{27,29,30} The maximal increases in plasma EPO, RBC count and hematocrit in MCAO

rats are 20-30% over sham controls. These responses remain below the magnitude required to increase blood viscosity or contribute to cerebral infarction.³¹⁻³³ As well, the amounts of brain EPO induced by MCAO are also relatively low,^{11,12} and likely insufficient to protect against acute cerebral ischemia. They may however play a neuroprotective role in the tolerance to further stroke episodes,¹⁵ by mechanisms involving prevention of neuronal cell death through inhibition of apoptosis.³⁴ By analogy, the moderate polycythemia observed in MCAO rats might represent an attempt to precondition the brain against subsequent ischemia.

Systemic hypotension is a feature of the MCAO model, but not present in the sham group.^{18,19} The results of the sham hypotensive group eliminate hypotension as a contributor to the observed hematological changes, and previous studies have demonstrated that controlled mild hypotension does not affect systemic oxygen delivery to tissues.^{35,36} Therefore, the hypoxia and the changes in hematological parameters in the stroke group appear independent of hypotension.

It is possible that the increase in hematocrit is simply the result of dehydration and hemoconcentration, but this is unlikely. Hydration was assured by subcutaneous administration of saline and, if hematocrit increased as a result of dehydration, a concomitant increase in WBC count would be seen as well. In this study, the increase in RBC and hematocrit was accompanied by a concomitant decrease in WBC, which is inconsistent with dehydration. Future studies measuring reticulocyte counts will provide additional proof of true erythropoiesis. Interestingly, a decrease in spleen white cells was previously observed in this same model,¹⁹ indicating that white cells may shift both from blood and spleen into other lymphoid and/or non-lymphoid tissues, including the ischemic brain. Alternatively, increased cell death may play a role. To our knowledge, this is the first study relating systemic hypoxia to plasma EPO increase and erythropoiesis following MCAO. This supports the hypothesis that hypoxia occurs after cerebral ischemia and may affect outcome.

References

1. Sulter G, Elting JW, Stewart R, den Arend A, De Keyser J. Continuous pulse oximetry in acute hemiparetic stroke. *J Neurol Sci.* 2000;179:65–69.
2. Roffe C. Hypoxaemia and stroke. *Rev Clin Gerontol.* 2001;11:323-335.
3. Roffe C, Sills S, Halim M, Wilde K, Allen MB, Jones PW, Crome P. Unexpected nocturnal hypoxia in patients with acute stroke. *Stroke.* 2003;34:2641-2645.
4. Miyamoto O, Auer RN. Hypoxia, hyperoxia, ischemia, and brain necrosis. *Neurology.* 2000;54:362-371.
5. Ratcliffe PJ. Molecular biology of erythropoietin. *Kidney Int.* 1993;44:887-904.
6. Semenza GL. Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1994;8:863-884.
7. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev.* 1992;72:449-489.
8. Czyzyk-Krzeska MF. Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaptation to hypoxia. *Respir Physiol.* 1997;110:99-111.
9. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci.* 1996;8:666-676.
10. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:10526-10531.
11. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253:26–32.
12. Bernaudin, M., Marti, H. H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E. T. & Petit, E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:643–651.
13. Sirén AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol. (Berl)* 2001;101:271–276.

14. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:4635-4640.
15. Prass K, Scharff A, Ruscher K, Lowl D, Muselmann C, Victorov I, Kapinya K, Dirnagl U, Meisel A. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke*. 2003;34:1981-1986.
16. Hata R, Maeda K, Hermann D, Mies G, Hossmann KA. Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:937-946.
17. Hitomi A, Satoh S, Ikegaki I, Suzuki Y, Shibuya M, Asano T. Hemorheological abnormalities in experimental cerebral ischemia and effects of protein kinase inhibitor on blood fluidity. *Life Sci*. 2000;67:1929-1939.
18. Zhu CZ, Auer RN. Graded hypotension and MCA occlusion duration: effect in transient focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995;15:980-988.
19. Gendron A, Teitelbaum J, Cossette C, Nuara S, Dumont M, Geadah D, du Souich P, Kouassi E. Temporal effects of left versus right middle cerebral artery occlusion on spleen lymphocyte subsets and mitogenic response in Wistar rats. *Brain Res*. 2002;955:85-97.
20. Kalaidjieva V. Modulation of erythropoiesis in rat bone marrow erythroblastic islands by cyclooxygenase inhibition. *Gen Pharmacol*. 1999;32:423-428.
21. Weinberger Principles of Pulmonary Medicine. 3rd edition. 1998 Saunders publishing. Chapter 1 pages 1 to 20.
22. Yoshimoto: Yoshimoto T, Kanakaraj P, Ying Ma J, Cheng M, Kerr I, Malaiyandi L, Watson JA, Siesjo BK, Maples KR. NXY-059 maintains Akt activation and inhibits release of cytochrome C after focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2002;947:191-198.
23. Back T, Kohno K, Hossmann KA. Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14:12-19.
24. Yager JY, Thornhill JA. The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21:167-174.

25. Lahiri S, Rozanov C, Roy A, Storey B, Buerk DG. Regulation of oxygen sensing in peripheral arterial chemoreceptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:755-774.
26. Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Grasso G, Corica F, Frisina N. Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection. *Clin Sci.* 2002;103:275-282.
27. Fried W, Johnson C, Heller P. Observations on regulation of erythropoiesis during prolonged periods of hypoxia. *Blood.* 1970;36:607-616.
28. Eckardt KU, Koury ST, Tan CC, Schuster SJ, Kaissling B, Ratcliffe PJ, Kurtz A. Distribution of erythropoietin producing cells in rat kidneys during hypoxic hypoxia. *Kidney Int.* 1993;43:815-823.
29. Shimizu S, Enoki Y, Sakata S, Kohzuki H, Ohga Y, Matsumura K. Erythropoietin response to acute hypobaric or anaemic hypoxia in gentamicin-administered rats. *Acta Physiol Scand.* 1994;151:225-231.
30. Kalaidjieva V. Development of bone marrow erythroblastic islands in hypoxic rats with intact or damaged kidney tubules. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1998;20:841-848.
31. Grotta J, Ackerman R, Correia J, Fallick G, Chang J. Whole blood viscosity parameters and cerebral blood flow. *Stroke.* 1982;13:296-301.
32. Kiyohara Y, Fujishima M, Ishitsuka T, Tamaki K, Sadoshima S, Omae T. Effects of hematocrit on brain metabolism in experimentally induced cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Stroke.* 1985;16:835-840.
33. Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21:857-864.
34. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:503-514.
35. van de Bor M, Meinesz J, Benders MJ, Steendijk P, Lopes Cardozo RH, van Bel F. Electrocardiac brain activity during hypoxia and hypotension in anesthetized newborn lambs. *Early Hum Dev.* 1999;55:237-245.

36. Fukusaki M, Nakamura T, Miyoshi H, Tamura S, Sumikawa K. Splanchnic perfusion during controlled hypotension combined with acute hypervolemic hemodilution: a comparison with combination of acute normovolemic hemodilution-gastric intramucosal pH study. *J Clin Anesth.* 2000;12:421-426.

TABLE 1. Time Course of Hematological Changes During the First 24 Hours After Reperfusion in MCAO and Sham Rats

Reperfusion			RBC	Hematocrit	WBC
Time (hours)	Group	n	($10^{12}/L$)	(L/L)	($10^9/L$)
0	Sham	5	6.41±0.28	0.38±0.02	8.80±1.01
	MCAO	5	5.94±0.52	0.34±0.03	8.98±2.14
1	Sham	5	5.53±0.21	0.32±0.01	6.42±0.66
	MCAO	5	5.81±0.19	0.33±0.01	6.32±0.73
2	Sham	4	6.31±0.13	0.36±0.00	9.50±0.80
	MCAO	5	6.06±0.20	0.35±0.01	7.84±0.83
4	Sham	5	6.21±0.11	0.35±0.01	12.50±2.04
	MCAO	5	6.58±0.33	0.37±0.02	9.12±0.84
6	Sham	4	5.51±0.51	0.32±0.03	10.80±1.26
	MCAO	5	6.48±0.46	0.36±0.03	9.72±0.62
18	Sham	5	6.76±0.15	0.39±0.01	10.90±1.20
	MCAO	5	6.74±0.36	0.39±0.02	9.64±1.15
24	Sham	5	6.88±0.23	0.39±0.01	9.10±0.89
	MCAO	6	7.17±0.21	0.40±0.01	6.74±0.72*

Values are expressed as mean±SEM.

*Different from sham group ($P<0.05$, ANOVA followed by Wilcoxon rank-sum test).

TABLE 2. Time Course of Hematological Changes in Sham-operated Animals with or without Hypotension

Reperfusion			MABP	RBC	Hematocrit	WBC
Time (hours)	Group	n	mm Hg	($10^{12}/L$)	(L/L)	($10^9/L$)
0	Sham + HYPO	10	59.82±0.60	6.25±0.11	0.36±0.01	5.90±0.50
	Sham	10	79.27±2.66	6.22±0.16	0.34±0.01	6.02±0.30
48	Sham + HYPO	10	58.38±0.59	6.49±0.22	0.38±0.01	8.55±0.53
	Sham	13	75.81±2.46	6.21±0.24	0.36±0.01	7.35±0.64
168	Sham + HYPO	9	57.32±1.09	6.56±0.18	0.39±0.01	9.38±1.23
	Sham	9	73.96±3.47	6.40±0.17	0.38±0.01	9.22±0.89

Values are expressed as mean±SEM.

Sham + HYPO : Sham-operated animals with MABP controlled at 60 mm Hg

Figure Legends

Figure 1. Time-dependent changes in SaO₂ levels after reperfusion in MCAO and sham rats. * $P=0.03$, MCAO versus sham.

Figure 2. Levels of SaO₂ (A), PaO₂ (B), and PaCO₂ (C) in groups of MCAO and sham operated rats at periods of 0-4 hours, and 6-24 hours after reperfusion. The P values of the statistical differences between MCAO and sham rats are indicated.

Figure 3. Temporal modulation of plasma EPO following transient MCAO in Wistar rats. * $P<0.05$, MCAO versus sham rats.

Figure 4. Changes in RBC (A), hematocrit (B), and WBC count (C) following MCAO in Wistar rats. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$, MCAO versus sham rats.

Figure 1

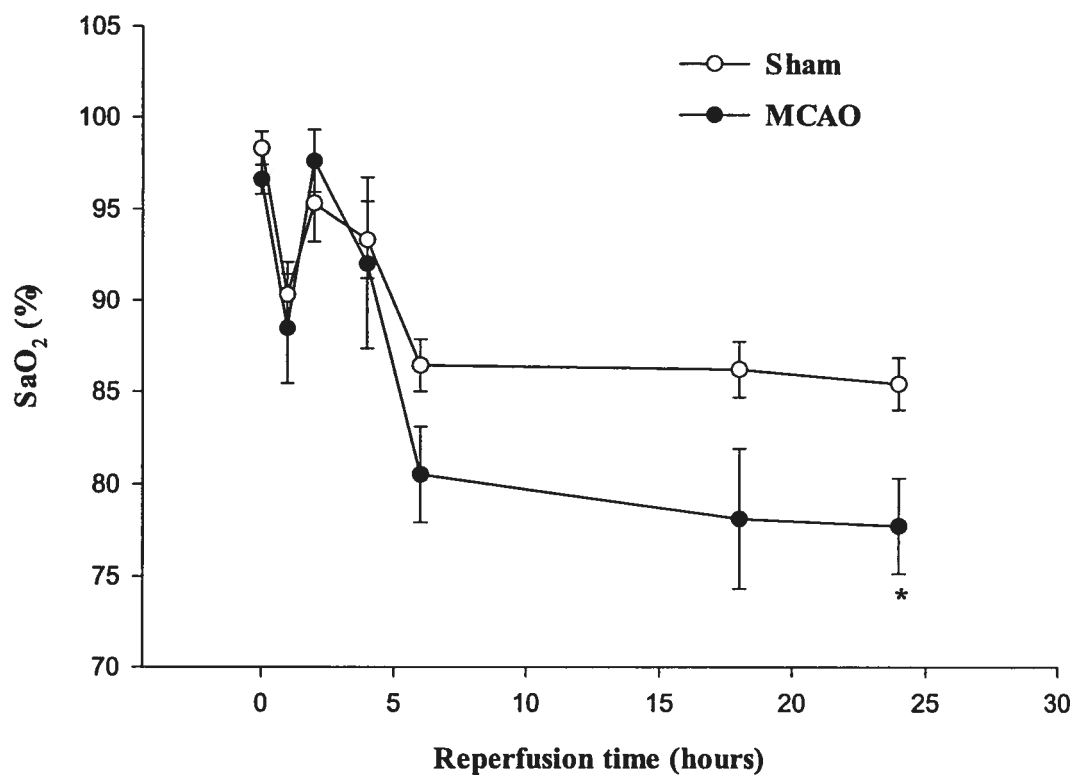


Figure 2

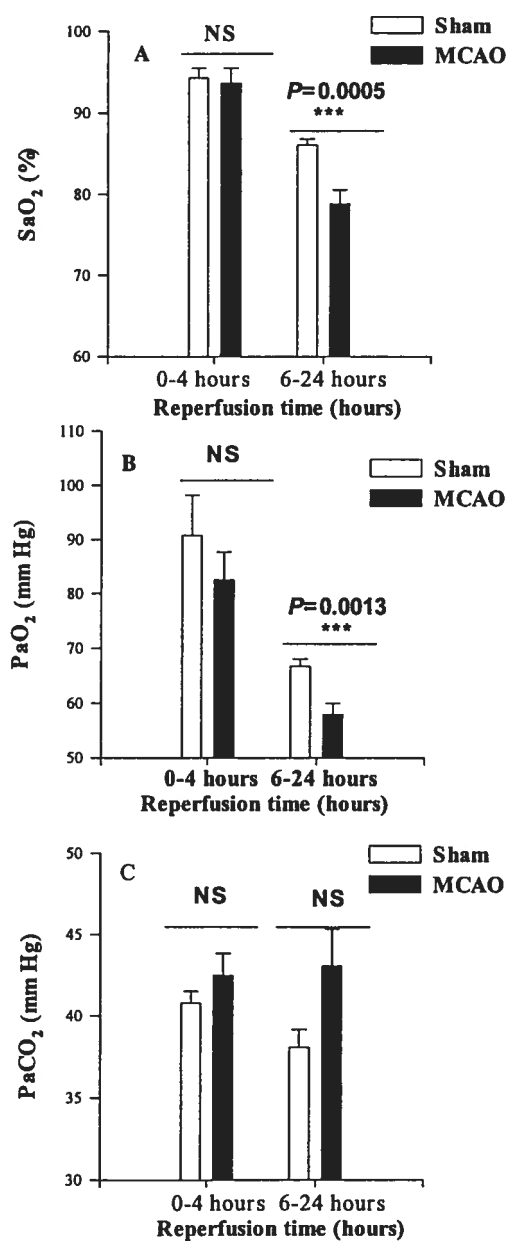


Figure 3

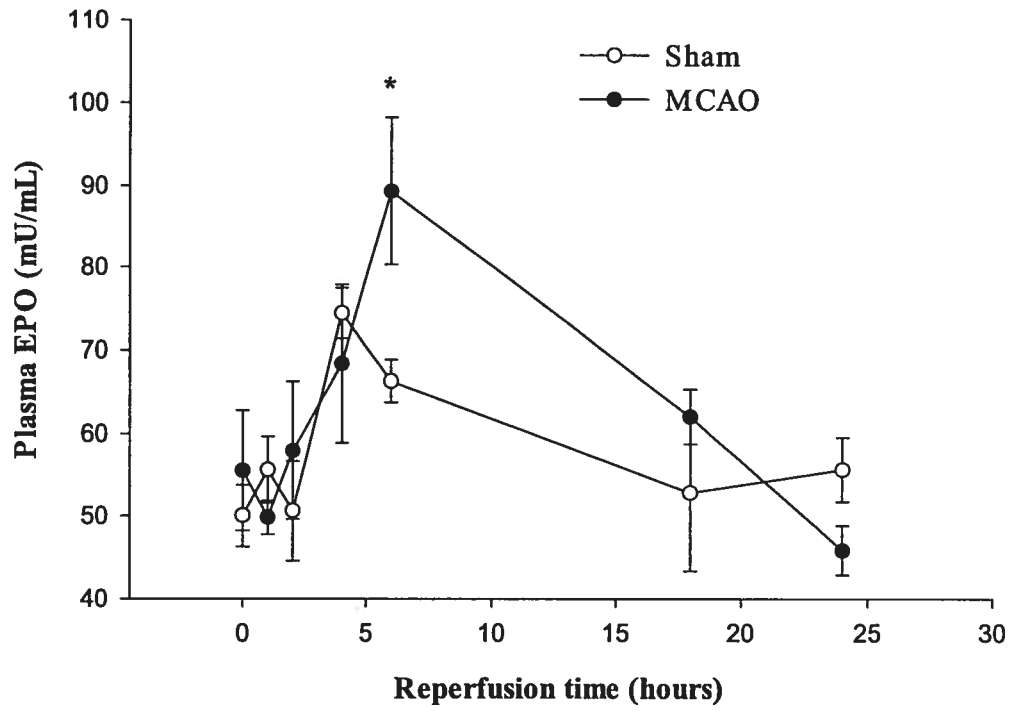
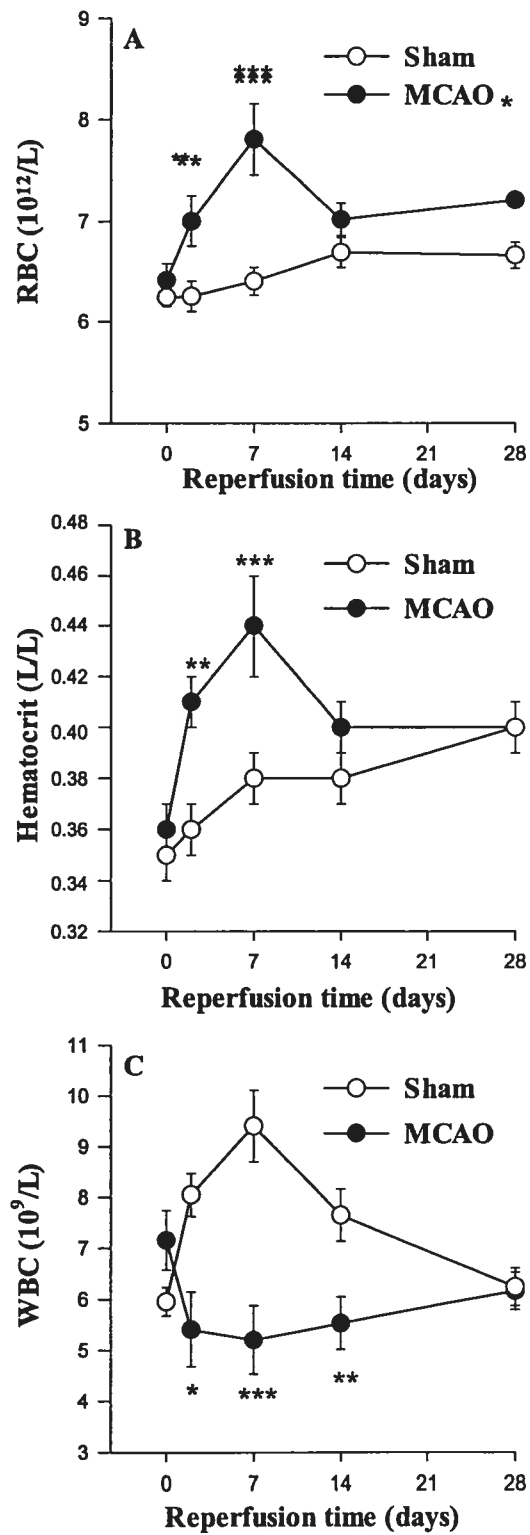


Figure 4



SYSTEMIC HYPOXIA AND THE INFLAMMATORY RESPONSE AFTER TRANSIENT CEREBRAL ISCHEMIA IN WISTAR RATS

Contribution des auteurs à l'article

Tous les auteurs de ce papier ont apporté une contribution significative au niveau intellectuel. Tous ont révisé le projet et ont contribué à l'évaluation du modèle ainsi qu'aux méthodes d'analyses.

Alain Gendron: Étudiant gradué au doctorat en pharmacologie a contribué à 75% des expérimentations.

Les docteurs Edouard Kouassi, Patrick du Souich et Jeanne Teitelbaum sont les co-superviseurs de l'étudiant gradué. Ils furent responsables de l'élaboration du projet. Le Dr Kouassi, directeur de l'étudiant gradué, fut responsable de l'aspect immunologique, le Dr Du Souich, de l'aspect pharmacologique et le Dr Teitelbaum de la composante neurologique de l'étude.

Ousmane Diallo a contribué à 25% de l'expérimentation et à l'élaboration du projet de recherche.

CHAPITRE 9

MANUSCRIT II

SYSTEMIC HYPOXIA AND THE INFLAMMATORY RESPONSE AFTER TRANSIENT CEREBRAL ISCHEMIA IN WISTAR RATS

Immunology 2004. Medimond International Proceedings. Collection of free papers presented at the 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS. Volume: Autoimmunity, Genetic and degenerative disorders, malignancies and transplantation. 2004; pp. 103-106.

Systemic hypoxia and the inflammatory response after transient cerebral ischemia in Wistar rats

A Gendron, O Diallo, J Teitelbaum, P du Souich, E Kouassi*

Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

* Corresponding author: Edouard Kouassi, Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 boulevard l'Assomption, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada. Tel.: 514-252-3400 ext. 3347; fax: 514-252-3569; [REDACTED] URL: www.guybernier.org

Summary

Systemic hypoxia is a common complication in stroke patients and may exacerbate inflammatory processes and ischemic brain damage. Using the transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) model in Wistar rats, we have shown previously that ischemic animals develop systemic hypoxia from 6 hours to at least 24 hours after reperfusion, leading to increases in plasma erythropoietin levels, followed by transient increases in red blood cell counts and hematocrit values from 2 to 7 days. The purpose of the present study was to evaluate whether post-stroke systemic hypoxia in MCAO rats is associated with increases in systemic expression of inflammatory cytokines in blood and spleen at the mRNA level, focusing on IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Results show that expression of the inflammatory cytokines is upregulated in ischemic brain tissue from 6 to 24 hours after reperfusion. No difference was observed between sham and MCAO rats in the expression of the cytokines in the peripheral tissues during the first 24 hours, while a marked increase was observed after 2 days of reperfusion, followed by a decline towards baseline levels after 7 days. These results indicate that post-stroke systemic hypoxia is associated with a transient systemic inflammatory response which may modulate erythropoiesis.

Introduction

Systemic hypoxia is a common complication in stroke patients (Roffe, 2001). Graded levels of hypoxia produced by lowering the inspired oxygen in the widely used middle cerebral artery occlusion (MCAO) stroke model in rats have shown that hypoxia exacerbates ischemic brain damage (Miyamoto et al, 2000). Recently, we have shown that systemic hypoxia spontaneously occurs from 6 hours until at least 24 hours after reperfusion in MCAO rats, supporting the previous clinical observations in stroke patients (Gendron et al, 2004). In response to the post-stroke hypoxia, plasma erythropoietin (EPO) was increased by 6 hours after reperfusion, followed by a moderate and transient polycythemia from 2 to 7 days after reperfusion (Gendron et al, 2004).

Stroke is associated with upregulation of a number of inflammatory mediators in the brain, including the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α which may contribute to ischemic brain injury (Dirnagl et al, 1999). In parallel, anti-inflammatory and neuroprotective mediators are induced after stroke, including neurotrophins (Tabakman et al, 2004) and EPO (Prass et al, 2003b). It is believed that the balance between these neurotoxic and neuroprotective mechanisms will determine the final outcome. While most studies focus on the inflammatory response in the ischemic brain, it is possible that a similar paradigm is operating in peripheral tissues, through development of systemic hypoxia, with potential impact on neuronal damage or repair. The purpose of the present study was to evaluate whether post-stroke systemic hypoxia in MCAO rats is associated with increases in systemic expression of inflammatory cytokines in blood and spleen at the mRNA level, focusing on IL-1 β , IL-6 and TNF- α ., and to compare the time course and intensity of the systemic response to that occurring in the ischemic brain.

Materials and Methods

Male Wistar rats underwent 1-hour transient MCAO under mechanical ventilation followed by reperfusion without further ventilation, as described elsewhere (Gendron et al, 2002). MCAO was induced in the left middle cerebral artery. Groups of 4-10 MCAO and sham-operated animals were evaluated at different times after reperfusion for assessment of arterial blood gases, plasma EPO, and complete blood count (Gendron et al, 2004). Total RNA was extracted by the Trizol reagent and cytokine mRNAs were measured in the left (ischemic) brain hemisphere, right (non-ischemic) brain hemisphere, whole blood, and

spleen cell suspensions using a multi-probe RNase protection assay system (BD Biosciences). Relative cytokine mRNA levels were calculated using L32 as a control. Statistical significance was assessed by ANOVA.

Results

Typical autoradiograms of protection assays of RNA samples from blood, spleen, left brain and right brain hemispheres are shown in Figure 1A. Quantitative analyses of cytokine mRNAs are represented in Figures 1B-1D. Expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α was induced in the ischemic brain by 6 hours after reperfusion, and the response was maximal after 18-24 hours with the following increasing order: TNF- α < IL-1 β \leq IL-6 (Figures 1A and 1B). No cytokine was detected in the non-ischemic brain during this period. Large amounts of IL-1 β and lower amounts of IL-6 and TNF α were expressed in blood and spleen in both sham and MCAO rats, with no significant difference between these animals in the first 24 hours after reperfusion, reflecting a non-specific response to the surgical stress (Figure 1A). However, IL-6 mRNA expression was markedly increased in blood (Figure 1C) and spleen samples (Figure 1D) from MCAO rats, as compared to sham controls, after 2 days of reperfusion ($P < 0.05$), and the response was normalized by day 7. Similar results were observed with IL-1 β and TNF α in blood and spleen after 2 and 7 days (not shown).

Conclusions

The results of this study reveal that transient MCAO upregulates expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α in blood and spleen. The response is delayed by about 24 hours as compared to expression of brain cytokines, and is transient, with a maximum at 2 days, and normalization by 7 days. It is likely that post-stroke systemic hypoxia is involved in the upregulation of these cytokines, as it is observed with increased plasma EPO levels. Future studies will determine the interplay between pro- and anti-inflammatory cytokines induced outside the brain by post-stroke hypoxia, and their potential detrimental and/or beneficial effects on neuronal damage and stroke outcome.

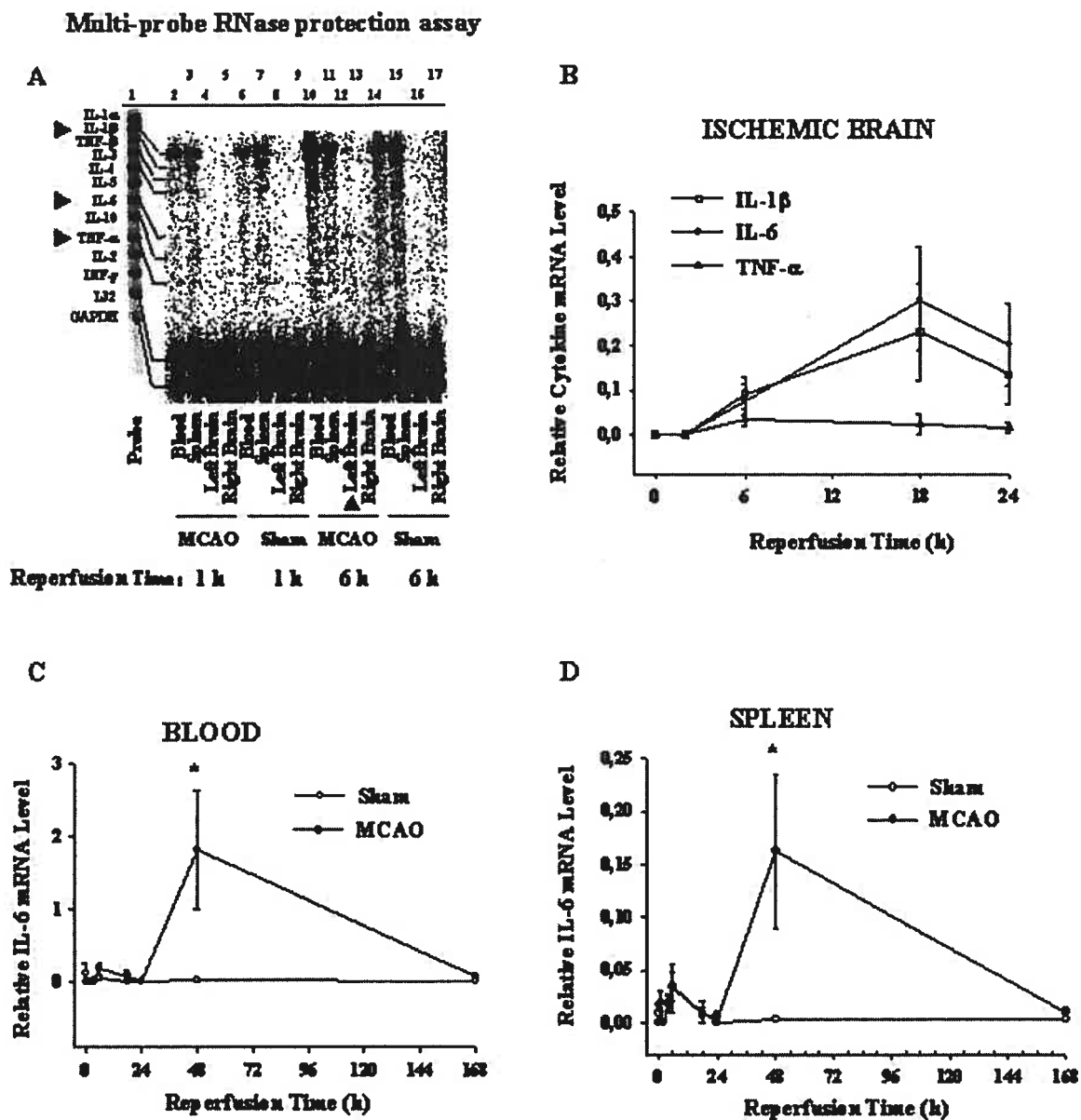
References

- DIRNAGL U et al, Pathobiology of ischaemic stroke : an integrated view, *TIPS*, 22, 391-397, 1999.
- GENDRON A et al, Temporal effects of left versus right middle cerebral artery occlusion on spleen lymphocyte subsets and mitogenic response in Wistar rats, *Brain Res*, 955, 85-97, 2002.
- GENDRON A et al, Transient middle cerebral artery occlusion influence on systemic oxygen homeostasis and erythropoiesis in Wistar rats, *Stroke*, In Press, 2004.
- MIYAMOTO O et al, Hypoxia, hyperoxia, ischemia, and brain necrosis, *Neurology*, 54, 362-371, 2000.
- PRASS K et al, Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin, *Stroke*, 34, 1981-1986, 2003.
- ROFFE C, Hypoxemia and stroke, *Rev Clin Gerontol*, 11, 323-225, 2001.
- TABAKMAN et al, Interaction between the cells of the immune and nervous system : neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury, *Prog Brain Res*, 146, 387-401, 2004.

Figure legend

Figure 1. Multi-probe RNase protection assay of inflammatory cytokines in MCAO and sham rats. Typical autoradiograms of protection assays of RNA samples from blood, spleen, left brain and right brain hemispheres (A). Time course of cytokine mRNA expression in the ischemic brain (B), blood (C), and spleen (D). * $P < 0.05$, MCAO versus sham rats (ANOVA).

Figure 1



**TEMPORAL EFFECTS OF LEFT VERSUS RIGHT MIDDLE CEREBRAL
ARTERY OCCLUSION ON SPLEEN LYMPHOCYTE SUBSETS
AND MITOGENIC RESPONSE IN WISTAR RATS**

Contribution des auteurs à l'article

Tous les auteurs de ce papier ont apporté une contribution significative au niveau intellectuel. Tous ont révisé le projet et ont contribué à l'évaluation du modèle ainsi qu'aux méthodes d'analyses.

Alain Gendron: Étudiant gradué au doctorat en pharmacologie a contribué à 70% des expérimentations.

Les docteurs Edouard Kouassi, Patrick du Souich et Jeanne Teitelbaum sont les co-superviseurs de l'étudiant gradué. Ils furent responsables de l'élaboration du projet. Le Dr Kouassi, directeur de l'étudiant gradué, fut responsable de l'aspect immunologique, le Dr Du Souich, de l'aspect pharmacologique et le Dr Teitelbaum de la composante neurologique de l'étude.

Stephen Nuara a contribué à 10% de l'expérimentation. Il a participé à l'élaboration du modèle animal et fut impliqué dans la validation des essais cliniques chez les rats après AVC.

Chantal Cossette a contribué à 20% de l'expérimentation et à contribué à l'élaboration du projet de recherche.

David Geadah a contribué à l'élaboration du projet et au dosage des catécholamines.

Marc Dumont est le statisticien qui a effectué l'analyse des résultats et a joué un rôle important dans l'interprétation des données statistiques.

CHAPITRE 10

MANUSCRIT III

**TEMPORAL EFFECTS OF LEFT VERSUS RIGHT MIDDLE CEREBRAL
ARTERY OCCLUSION ON SPLEEN LYMPHOCYTE SUBSETS
AND MITOGENIC RESPONSE IN WISTAR RATS**

Brain Research. 2002;955:85-97

Temporal effects of left versus right middle cerebral artery occlusion on spleen lymphocyte subsets and mitogenic response in Wistar rats

Alain Gendron^a, Jeanne Teitelbaum^b, Chantal Cossette^b, Stephen Nuara^b, Marc Dumont^b, David Geadah^b, Patrick du Souich^a, Edouard Kouassi^{b,c,*}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

^b Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada

^c INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, Quebec, Canada

* Corresponding author: Edouard Kouassi, Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 boulevard l'Assomption, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada. Tel.: 514-252-3400 ext. 3347; fax: 514-252-3569; [REDACTED]
[REDACTED] URL: www.guybernier.org

Acknowledgements

We thank Dr. Ashfaq Shuaib from the University of Alberta for his helpful advices and assistance with the animal model, and Dr. Yang Li from the University of Alberta for assessment of infarct volumes. We would like to thank Dr Simon Sydserff from AstraZeneca for providing us with the threads used in the MCA occlusion model. We gratefully acknowledge Sylvie Arbour for expert technical assistance. This work was supported by grants from Fonds de la Recherche en Santé du Québec/AstraZeneca (981120 and 005086).

Abstract

The left and right neocortex of the brain has been shown to exert asymmetrical effects on the immune system. In the present study, we used a middle cerebral artery (MCA) occlusion model in Wistar rats to analyze the influence of unilateral CNS ischemia on spleen cell number and function. The occlusion time was 1 h, followed by reperfusion with survival for 0, 2, 7, 14, and 28 days. Changes in plasma norepinephrine levels were used as an index of peripheral sympathetic activity. Results showed that the total number of spleen cells significantly decreased after 2-28 days of survival in animals with cerebral ischemia compared to sham-operated controls. There was no change in the percentage of CD5⁺-CD4⁺ T cells, MHC class II⁺ cells, and ED1⁺ macrophages. However, the percentage of CD5⁺-CD8⁺ T cells decreased at 2 days, resulting in increased CD4/CD8 ratio, and both parameters returned to control levels after 7 days. Mitogen-induced T and B lymphocyte proliferation increased after 0-28 days post-ischemia independently of the mitogen used. There was no difference in immune response or norepinephrine levels between left and right MCA occlusions. These results are consistent with the notion that cerebral ischemia induces mobilization of certain immune cells from the periphery to the brain, where they may contribute to the local inflammatory response. Additionally, the data indicate that cerebral ischemia is followed by a systemic activation of T and B lymphocytes. Absence of asymmetric effects of left versus right stroke, and failure to demonstrate any suppressive effects of left-sided lesions on lymphocyte proliferation, probably reflects the fact that these large cerebral ischemic lesions affect both cortical and subcortical areas.

Theme: Endocrine and autonomic regulation

Topic: Neural-immune interactions

Keywords: Cerebral ischemia; Cerebral lateralization; Lymphocyte subsets; Lymphocyte proliferation

1. Introduction

Functional, anatomical and neurochemical studies have all shown that the left and right hemispheres do not have identical functions [17-19]. Speech and hand dominance are a function of the dominant hemisphere, whereas spatial awareness, affect and melody are properties located in the non-dominant hemisphere [22]. These are just a few examples of cerebral lateralization. During the last few years, there has been growing evidence that cerebral autonomic outflow is lateralized as well. In the rat, right hemisphere infarcts have greater sympathetic consequences than left hemisphere infarcts, including changes in mean arterial blood pressure, renal sympathetic nerve discharge, electrocardiogram tracings, and plasma norepinephrine (NE) levels [21]. Similarly, in patients with acute stroke, the control of cardiac autonomic function is impaired in a lateralized fashion, with sympathetic predominance in right hemisphere strokes [49].

Although the immune system was once thought to be independent of central neural influence, recent studies demonstrate a link between autonomic nervous system activity and the peripheral immune response. Indeed, the sympathetic nervous system is one of the major pathways whereby the CNS signals the immune system [32]. Studies in mouse [43,48] and rat [4,34] have looked at the effects of cortical lesions on the immune system. These studies showed that lesions of the left neocortex depress T-cell immunity, whereas right-sided lesions enhance it. Cerebral neocortex modulation of other immune functions seems to be lateralized as well, including natural killer cell activity [2,7] and phagocyte functions [42]. All these functions are reduced by left-sided cortical lesions, and increased or unchanged by right-sided lesions. Hemispheric asymmetries in immune regulation have been confirmed by behavioral approaches and are thought to be related to asymmetries in brain monoaminergic neurotransmitters [3,11,41,44,45]. In humans, one study [37] examined the differential immunologic effects of dominant versus non-dominant cerebral resections in 11 adult patients requiring surgery for epilepsy. Absolute lymphocyte count, total T cells, CD4⁺ helper T cells and CD8⁺ suppressor T cells were all reduced after a dominant hemisphere resection, but were increased after non-dominant resection. Taken together, these findings suggest that the cerebral cortex influences the peripheral immune system, and that this influence is lateralized.

Certain areas of the CNS have been more specifically linked to the control of the immune response. Roszman and colleagues found that electrolytic lesions in the anterior hypothalamus suppressed a variety of immune parameters including spleen and thymus

cell numbers, and spleen cell responsiveness to mitogens [9,53], whereas lesions in the hippocampus, amygdala and mamillary bodies increased these same parameters [8,53]. The response was not only lesion-specific, as described above, but transient, observed only during the first 4 days following the lesion [10].

Stroke has been shown to be associated with altered immune function, especially in the brain. The local cerebral immune and inflammatory responses to stroke involve upregulation of several inflammatory mediators, including cytokines, chemokines, cell adhesion molecules, and reactive oxygen and nitrogen species that contribute to neuronal damage [1,23]. Such mediators are released by resident cells (e.g., microglia, astrocytes), and by peripherally-derived leukocytes infiltrating the CNS following disruption of the blood-brain barrier, and exposure of relatively sequestered CNS antigens to the peripheral circulation [24,26,28,31,40,56-58]. Impairment and lateralization of immune function in the periphery are likely to occur after ischemic stroke, given the reported asymmetries of stroke-induced sympathetic consequences and the important role of the sympathetic nervous system in immune regulation. Some clinical observations have postulated the existence of cerebral lateralization of immunomodulation following stroke. In 25 elderly right-handed patients with acute stroke (11 right, 14 left), a decrease in peripheral blood lymphocyte counts and functions, and an increase in the incidence of severe infections were clearly more frequent when the stroke was located in the left hemisphere [29]. Lateralization of T-cell mediated cutaneous inflammatory responses was also found in patients with stroke [61,62]. Our own preliminary data in elderly male patients, including 5 left, 5 right, and 5 age-matched normal controls, indicated a 56% inhibition of the *in vitro* proliferative response of peripheral blood T lymphocytes to phytohemagglutinin A (PHA) in patients with left stroke [55]. The response was not affected in patients with right stroke. The inhibition of the T cell mitogenic response was maintained in left stroke patients during the entire period of examination of 3 consecutive weeks beginning at least 15 days after the onset of ischemia. In this study, only subjects with unilateral neocortical lesions after a thrombotic cerebrovascular accident were selected by using Doppler ultrasound and tomodensitometry, excluding subcortical and bilateral damage [55].

In the present study, we used a well-established transient middle cerebral artery (MCA) occlusion stroke model in Wistar rats [5,13,66] to evaluate whether cerebral ischemic lesions lead to changes in immunologic functions in the periphery, and if these changes are lateralized. To this end, we measured spleen cell number and subsets, and mitogen-induced spleen T and B lymphocyte proliferation at different time intervals

after a left or right-sided cerebral ischemia, and compared them to sham-operated controls. In addition, changes in plasma NE levels were used as an index of peripheral sympathetic activity.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Thymidine [methyl-³H] (specific activity 2 Ci/mmol) was purchased from PerkinElmer Life Sciences (Mississauga, Canada). All other drugs and reagents were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2. Animals and experimental design

All procedures were carried out in accordance with current guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Adult male Wistar rats (Charles River) were housed in groups of 3-5 and maintained under a natural light cycle of 14 h light/10 h dark, with food and water available ad libitum. Animals were fasted for at least 3 h before surgery and weighed prior to the start of the surgical process. The weight range was limited to 350-400 g. Just before the induction of anaesthesia the rats were given a cursory neurologic exam to ensure that they were able to move, walk, and feed normally, and to set normal values for the neurological tests (described in section 2.3). Any abnormalities excluded the animals from further study. The animals were then given atropine sulfate sub-cutaneously (5mg/kg) and, 15mins later, anesthesia was induced with 5% isoflurane in nitrous oxide/oxygen (70:30). Anesthetic gases were then reduced to 2% and the animal was allowed to breathe via face mask for 5 min. The animals were intubated and connected to a ventilator (Harvard model 683 rodent ventilator); the volume insufflated was 10 ml/kg at a rate of between 50-60 breaths per minute. Body temperature was maintained at 37±0.5 °C with a temperature control system (Harvard Homeothermic Blanket Control unit).

The tail artery was cannulated with an Abbocath 26-gauge Cathlon and blood pressure was recorded via a disposable transducer linked to the amplifier (Gould 13-6615-50 preamp and 6600 amp case) and viewed as hard copy on a chart recorder (Graptec mark8). The blood pressure was maintained at a mean of 75 mm Hg and blood samples were collected for blood gases, and glucose level pre and immediately post ischemia. The total blood removed never exceeded 400 µl. P_{CO2}, P_{O2}, and pH were measured using a blood gas analyzer (Radiometer ABL520, Copenhagen, Denmark).

Once blood gas results were verified, the animal's ventilatory rate was adjusted if necessary to maintain normal levels of oxygen and carbon dioxide.

The left or right MCA was occluded using an intraluminal thread technique described in detail elsewhere [5,66]. The common carotid, external carotid, internal carotid and pterygoid arteries were exposed and isolated through a midline cervical incision. A 32mm length of 3-0 monofilament coated with poly-L-lysine with a diameter of 0.26-0.30 mm was inserted into the external carotid and carefully advanced into the internal carotid artery. The suture was then advanced upwards, carefully avoiding entry into the pterygopalatine artery, and the suture was stopped when gentle resistance was felt (at approximately 22-26 mm), thereby occluding the origin of the MCA. A sudden transient systemic blood pressure drop was an indicator of proper thread placement as previously demonstrated by Sutherland et al. [59]. Sham-operated animals underwent the same surgical treatment but had no suture inserted into the internal carotid artery. The blood pressure of all animals was then reduced to 60 mm Hg by increasing the concentration of isoflurane for a period of 60 min. The thread was then withdrawn, wounds were closed, and the animals were allowed to recover in a room where the ambient temperature was maintained at 21.6-21.8 °C.

A total of 10 to 15 animals in each of left or right sham-operated groups and 5 to 9 animals in each of left or right middle cerebral artery occlusion groups were killed at 5 different time intervals (0, 2, 7, 14, and 28 days) after the surgery. For each survival time, the animals were divided into sham (left and right), right-sided infarct and left-sided infarct groups.

After the detailed neurological assessment (described in section 2.3), the animals were anesthetized and blood (10 cc) was taken for analysis via cardiac puncture. The spleen was aseptically removed and placed in a Petri dish containing sterile RPMI 1640 medium. Spleen cells were gently teased, and large cell clumps were removed. After washings by centrifugation, cells were suspended in a culture medium consisting of RPMI 1640 medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum, 20 mM L-glutamine, penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml), and 0.02 mM 2-mercaptoethanol. Cell counting and viability were assessed by trypan blue exclusion, and viability of freshly isolated spleen cells was always greater than 95%, without any difference between the different experimental groups. Immunophenotyping of spleen cells and mitogen assays were performed as described below, and were all done by a person blinded to the source.

The animals were then perfused with saline and the brains were removed. The brains were sectioned into 2 mm slices and put into a solution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) for 30 min for staining. The infarct volume was visualized as pale areas with lack of staining, and it was directly calculated using computerized planimetric analysis. Images were digitalized and areas expressed as a summation of pixels calculated with a digital software (ScanPro, version 5). Then, infarct volumes were expressed as a percentage of the ipsilateral hemisphere. To compensate for brain swelling in the ischemic hemisphere, we used the formula described previously [5]. Furthermore, in order to determine macroscopically which areas were affected, the lesions at each level were transposed onto templates and assessed by using a mapping technique [60].

2.3. Neurological assessment

After a period of 0-28 days post-ischemia, the animals were weighed and clinical signs were assessed using 2 neurological scales. The Rogers' scale [51] is a functional 8-point scale that measures the severity of a focal motor deficit. The scale varies from 0, which is no deficit, to 7, which represents the death of the animal. A score of 4 represents severe weakness. The scale adapted from Garcia et al [16] uses a battery of tests to assess the sensory, motor and sensorimotor deficits induced by the stroke. These tests assess exploratory behaviour, symmetry of locomotion pattern, front paw outstretching, postural adjustments, palpebral reflex, and reaction of the palpation of vibrissae. The calculation of the degree of the impairment uses the percentage of post-compared to pre-ischemic evaluations ($\text{post/pre-ischemia} \times 100$).

2.4. High-performance liquid chromatography determination of NE in plasma

Blood samples were transferred to microfuge tubes that had been rinsed with a preservative solution containing reduced glutathione (75 mg/ml) and ethyleneglycol-bis, β -aminoethyl ether, N,N'-tetraacetic acid (EGTA, 90 mg/ml). Immediately following collection, the plasma was separated by centrifugation and frozen at -80 °C. NE concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection, using the Waters Plasma Catecholamine Analysis System (Waters, Milford, MA). Briefly, 50 μ l of an internal standard solution of 3,4-dihydroxy-benzylamine (DHBA) (10 ng/ml), 400 μ l of 2 M Tris/EDTA buffer (pH 8.7), and 10 mg of alumina were added to 500 μ l of plasma samples. After vortexing, the alumina was washed with 0.2% Tris/EDTA (pH 8.1), and NE was extracted by the

addition of 100 μ l of an elution reagent containing acetic acid, sodium disulfite, and EDTA. Samples were then centrifuged to extract the eluted NE. The eluate (25 μ l) was injected into the Waters chromatographic system, which consisted of a Model U6K liquid chromatography injector, a Model 590 HPLC pump, a reverse phase 15 cm x 3.9 mm (i.d.) column packed with C₁₈ 5- μ m beads and a Model 460 amperometric detector equipped with a glassy carbon electrode maintained at a potential of +0.6 V. The mobile phase (pH 4.5) consisted of 0.05 M sodium acetate, 0.02 M citric acid, 1 mM dibutylamine, 3.75 mM sodium octyl sulfate, 0.134 mM disodium EDTA, and 50 ml methanol in 1 L of nanopure water. The flow rate of the mobile phase was 1.0 ml/min. Peak areas were integrated with the Waters 745 Data Module, and NE concentrations (pmol/L) were calculated with reference to calibrators provided by the manufacturer and subjected to the same procedure as the plasma samples.

2.5. Immunophenotyping of spleen cells

The relative distribution of spleen lymphocyte subsets and spleen macrophages were determined by direct immunofluorescence and analyzed by flow cytometry. For these studies, we used the following mouse IgG1 anti-rat monoclonal antibodies, all provided by Serotec (Oxford, UK): phycoerythrin-conjugated anti-rat CD5 (OX-19) that recognizes a 69 kD cell surface glycoprotein expressed by rat T lymphocytes; fluoresceinated anti-rat CD4 (W3/25) recognizing a 55 kD cell surface glycoprotein expressed by helper T lymphocytes and weakly by monocytes; fluoresceinated anti-rat CD8 (OX-8) for cytotoxic/suppressor T cells; fluoresceinated anti-rat I-A (OX-6) that recognizes a monomorphic determinant on rat MHC RT1B class II molecule present on B lymphocytes, dendritic cells, some macrophages, and certain epithelial cells; fluoresceinated anti-rat monocytes/macrophages (ED1⁺) that recognizes a single chain glycoprotein of 90-110 kD expressed by the majority of tissue macrophages and weakly by peripheral blood granulocytes. CD5⁺-CD4⁺ and CD5⁺-CD8⁺ T lymphocytes were determined by double staining with OX-19/W3/25, and OX-19/OX-8, respectively. Fluoresceinated and phycoerythrin-conjugated mouse IgG1 (Serotec) were used as negative controls. Lymphocytes isolated from the spleen were washed in 1% cold PBS with 0.1% sodium azide and 0.1% BSA. The cells were then incubated (5×10^5 cells/sample) with antibodies for 30 minutes at 4 °C in the dark. Following two washes, the cells were resuspended in PBS-formaldehyde 0.1%. The percentage of positive cells and their fluorescence intensity were analyzed on a FACS Calibur flow cytometer

(Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Dead cells were excluded by gating with propidium iodide.

2.6. Mitogen assays

Mitogen assays were performed as described in detail elsewhere [12,25]. Splenic lymphocytes were obtained as described above and used at a final density of 4×10^5 cells per well in a total volume of 0.2 ml. Mitogens were added at their final optimal concentrations. These include PHA (50 $\mu\text{g/ml}$) for stimulation of T lymphocytes, pokeweed mitogen (PWM, 5 $\mu\text{g/ml}$) for T-dependent stimulation of B lymphocytes, lipopolysaccharide (LPS, 10 $\mu\text{g/ml}$) plus dextran sulfate (DxS, 10 $\mu\text{g/ml}$) for T-independent stimulation of B lymphocytes, and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA ; 10 $\mu\text{g/ml}$) plus ionomycin (Iono, 500 $\mu\text{g/ml}$) for receptor-independent stimulation of both T and B lymphocytes. Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The optimal incubation times were 96 h for PHA, LPS+DxS and PWM, and 72 h for PMA+Iono in all experimental groups, as determined by kinetic studies at culture time points of 48-120 h. Cultures were pulsed with ³H-thymidine (1 μCi in a volume of 10 μl) for the last 6 h of the incubation period. Cell nuclei were harvested, and radioactivity was counted with a Wallac System 1409 scintillation counter (Wallac Oy, Turku, Finland). Determinations of ³H-thymidine uptake were made in sextuplicate wells, and results were expressed as proliferation index given by the ratio between stimulation in the presence of mitogens/controls without mitogens.

2.7. Statistical analysis

After data validation and normality checks, the effects of the three main factors involved in the study's design (group, hemisphere, and time of reperfusion post-ischemia) were assessed using analysis of variance based on the general linear model, except for the focal deficits evaluated by the Rogers' scale. The component "time post-ischemia" was treated as a within-subject (repeated) factor, with the Huynh-Fedlt correction for non-sphericity. Simple main effects were calculated for all significant interactions and Sidak's correction was used for post hoc comparisons. Focal deficits were analyzed with the Mann-Whitney test. P values of less than 0.05, 0.01, and 0.001 were indicated by *, **, and ***, respectively.

3. Results

3.1. Physiological parameters and plasma NE levels

Almost 30% of our animals died during the first 7 days following their stroke. This is what one expects after severe stroke and reflects the severity of the ischemic lesions. Table 1 shows that all physiological parameters except blood pressure are similar in the infarcted and the sham animals both pre and post procedure. As mentioned, blood pressure was deliberately reduced during the occlusion of the MCA to allow a significant amount of cerebral ischemia. Of note is that all animals with infarct, be it right or left, showed the same autonomic response of the blood pressure at the time of occlusion. This response was a sudden transient blood pressure drop at the moment of thread insertion. To further assess autonomic response, plasma NE was measured in the various groups at the first three time points, i.e. at 0, 2, and 7 days of reperfusion post-ischemia. As shown in Table 2, NE levels increased gradually with time within the sham group reaching a significant level by 7 days ($p = 0.027$), as compared with NE levels at day 0. At day 2 post-ischemia NE levels were significantly higher than baseline (day 0, $p = 0.004$) as well as significantly higher than the sham animals at day 2 ($p = 0.04$). The NE levels in the ischemia group returned to baseline at day 7, and there was no difference between sham and ischemia NE levels at that point in time. There was no difference in the increase of NE between right and left infarcts.

Fig. 1 shows the changes in the body weight in sham and infarcted animals. There was a significant loss in body weight noted in the animals with left- and right-sided stroke who were sacrificed within the first 14 days. The animals who lived longer than 14 days were able to recover, and they regained the initial weight loss. There was no significant weight loss in the sham group, but a weight gain was observed with time, which was significant by 14 and 28 days. The body weight changes seen in the rats with left and right MCA occlusion may be considered as a marker of severity of the disease.

3.2. Infarct volume and neurological deficits

No difference was found in the volume of infarcts between the left and right hemispheres at all times of sacrifice (Table 3). The volume of infarct expressed as a percentage of the total hemispheric volume was significantly different in the ischemic animals compared to sham. This difference is present at all times of sacrifice except at time 0. At 2 and 7 days after the ischemic event, the infarct volume was about 30% of the total hemispheric volume (Table 3), and the clinical deficit on the scale used by

Rogers et al. [51] was considered moderate to severe (score of ≥ 3) (Table 4). At 14 and 28 days after ischemia, the infarct volume was between 13 and 18% of total hemispheric volume (Table 3), and the neurological deficit was classified as mild to moderate (score of ≤ 3) (Table 4). The cortical and subcortical components of the infarct were measured (Fig. 2). Results show that almost one-third of the ischemic damage was in the subcortical area, with similar results in both left and right MCA occlusion. The areas uniformly affected by ischemia included the striatum (caudate, putamen and globus pallidus), the internal capsule and the sensory-motor cortex. The amygdala was ischemic in most but not all animals, there were distant lesions in the hippocampus, but the hypothalamus was rarely if ever affected (not shown).

The severity of the clinical neurological deficits correlated with the size of the infarct when the motor or sensory-motor deficit is assessed (clinical focal symptoms on the Rogers' scale: $r = 0.654$, $p < 0.001$; motor score on modified Garcia's scale: $r = -0.496$, $p < 0.001$; sensorimotor score on modified Garcia's scale: $r = -0.461$, $p < 0.001$). If only the sensory component is evaluated using the modified Garcia's scale, there is a significant difference between sham and ischemic rats ($p < 0.001$) (Table 4), but there is a poor correlation with the size of the infarct ($r = -0.063$, $p = 0.675$).

3.3. Effects of MCA occlusion on spleen cell number and subsets, and on mitogen-stimulated T and B lymphocyte proliferation

The total number of spleen leukocytes was significantly decreased in all animals with cerebral ischemia compared to sham operated animals from day 2 to day 28 post-ischemia (Fig. 3). Within the ischemia group, a significant loss of spleen leukocytes was noted at day 7 compared to day 0 ($p = 0.035$), followed by a return to day 0 values by 14 and 28 days ($p = 0.235$, and $p = 0.710$, respectively). Unlike the ischemic rats, in the sham group the number of spleen leukocytes increased with time, particularly by 14 and 28 days ($p < 0.006$, and $p < 0.002$, respectively), reflecting the increase in age of the animals. The changes in spleen leukocyte number noted after ischemia were the same for left- and right-sided infarction. In addition, the changes in spleen cell number (Fig. 3) are closely parallel to those observed in the body weight (Fig. 1), both in ischemia and sham groups. Table 5 illustrates the distribution of spleen $CD5^+$ - $CD4^+$ T lymphocytes, MHC-class II⁺ leukocytes, and ED1⁺ macrophages. No significant change in the relative distribution of these cell populations could be found between the sham operated animals and the animals with left- or right-sided ischemia. In the animals sacrificed 48 h after the infarct, there was a significant decrease in the proportion of

CD5⁺-CD8⁺ T lymphocytes compared to sham operated animals ($p < 0.001$), but with no difference between left and right infarcts, and this returned to normal values thereafter (Fig. 4A). Because of these transient decreases of CD8⁺ T cells at 48 h of reperfusion, there was a significant increase in the CD4/CD8 ratio in the animals with cerebral ischemia compared to sham operated animals ($p = 0.009$), but without any left/right difference (Fig. 4B).

Proliferative responses of spleen lymphocytes to PHA, PWM, LPS+DxS, and PMA+Iono are summarized in Table 6. The proliferation indices of lymphocytes from infarcted rats were significantly increased as compared to sham-operated animals, with the percentage of increase ranging from 37 to 75% depending on the mitogen. These increases occurred independently of the time to sacrifice (0-28 days post-ischemia) or the side of the ischemic lesion.

4. Discussion

The hypothesis that the immune and central nervous systems are functionally linked has been the focus of a lot of attention in the last two decades [6,32,63]. Previous studies in animals showed evidence that the neocortex was implicated in the modulation of the immune system [4,34,44,48]. These studies demonstrated that lesions of the left neocortex depress whereas right lesions enhance T-cell immunity in the periphery, suggesting a lateralization of the cerebral control of immune responses. Others have shown that it is the area of the damage rather than the side of the lesion that modulates the immune response to ischemia. Lesions in the hypothalamus were immunosuppressive while those in the hippocampus and amygdala resulted in immunostimulation [9,10,52-54]. In the present study, we used a modified version of the transient MCA infarct model, which produces both cortical and subcortical lesions and tends to spare the hypothalamus [20,47,66], to study the effects of unilateral ischemic lesions of the brain on immune cell number and subset distribution, as well as on lymphocyte mitogenic responses in the rat spleen. We first validated the MCA occlusion model by carefully assessing the functional outcome of each animal, and correlating neurologic impairments with the volume of infarct. There was a good correlation between motor or sensorimotor deficits and volume of infarct. The sensory deficits found on testing with the clinical scales were easily detected but did not correlate with infarct volume. A likely explanation is that the degree of sensory impairment rarely reflects the size of the damage. For instance, small thalamic lesions can lead to profound sensory abnormalities. Body weight decreased rapidly after stroke

during the first 14 days. Thereafter, weight loss became less marked and was followed by recovery to baseline. Body weight may be an indirect index of ischemic brain damage. The animals may be unable to swallow, unable to get to their food and water or have damage to hunger centers [15]. Alternatively, the animals may be too somnolent to feed.

Most of the animals sacrificed at 2 and 7 days post-ischemia had infarct volumes of approximately 30% of total hemispheric volume, which correlate with moderate to severe neurological deficits (score of ≥ 3 in the scale used by Rogers et al. [51]). The animals sacrificed at 14 and 28 days had smaller volumes and only mild to moderate neurological deficits (score of ≤ 3 in the scale used by Rogers et al.). This is a reflection of the scarring and retraction that is known to occur with time. Time-dependent reduction of the motor score deficits is likely due to brain plasticity and the ability of neighboring brain tissue to take over some of the function of the infarcted tissue. Indeed such recovery is seen in other similar models [46]. The size of infarction in our animals sacrificed prior to or at day 7 was larger than the infarcts produced by Zhu and Auer [66] for the same BP (60 mm Hg) and time of occlusion (60 min) ($11 \pm 8\%$). This might be due to the fact that we used a thread coated with poly-L-lysine, which encourages adhesion of the suture to the adjacent vascular endothelium [5]. The infarct volumes showed little variability for the same degree of neurological damage, making it a reliable model. No difference in the volume of infarcts was seen between the left and right hemispheres, indicating that infarct size does not play a role in the immunologic changes induced by left versus right MCA occlusion. Also, the good correlation observed between the clinical score and the size of the infarct confirms that the scales used to measure the sensorimotor deficit are a good reflection of the size and severity of the infarct.

In our MCA occlusion stroke model, the total number of spleen cells is decreased at 2-28 days of reperfusion in both left and right cerebral ischemia. This decrease reaches a peak at day 14 and thereafter the number of cells increases progressively but still remains significantly lower than control values. There were no changes in the percentage of splenic $CD5^+$ - $CD4^+$ T cells, MHC class II^+ cells, and $ED1^+$ macrophages between animals with left and right cerebral ischemia compared to their respective sham-operated controls. However, the percentage of cytotoxic $CD5^+$ - $CD8^+$ T cells transiently decreased 48 h post-ischemia in both left and right animals with cerebral ischemia and returned to that of the control animals by 7 days post-ischemia. These results indicate that cerebral ischemia elicits an efflux of spleen cells, which

affects all leukocyte populations, with more profound and transitory effects on CD8⁺ T lymphocytes. The kinetics of changes in spleen leukocyte numbers after MCA occlusion correlates well with previous studies showing influx of macrophages, CD5⁺ T cells, primarily CD5⁺-CD8⁺ T cells, and natural killer cells in rat brain with ischemic lesions produced by photothrombosis [26] or permanent MCA occlusion [56]. In a transient cerebral ischemia model produced by intraluminal occlusion of the right MCA for 1 h, which is similar to our own model, it was found that invading neutrophils migrate and accumulate in the ischemic areas between 1 and 3 days, followed by massive infiltration of macrophages at 3-14 days [28,64]. Thus it appears that leukocytes from peripheral immune tissues, including peripheral blood and spleen, are contributing to the immunologic response triggered by CNS ischemia by leaving the periphery and quickly penetrating within the CNS. As leukocytes are mobilized and sequestered in the CNS, there might be a decrease in their number in the periphery. The fact that splenic CD8⁺ T cells decrease more importantly than CD4⁺ T cells suggests that the former, but not the latter, are involved as effector cells in ischemia-induced immune response. CD4⁺ and CD8⁺ T cells are known not only to recognize different classes of antigens, but also to undergo limited and extensive proliferation, respectively, in response to antigenic stimulation, in order to suit their roles as regulators and effectors [14]. Our results reveal also that the proliferative responses of splenic T and B lymphocytes to various mitogens are increased in animals with cerebral ischemia compared to sham controls. The increased lymphocyte proliferation appears very early at the end of MCA occlusion, and it persists during all the observation period of 28 days post-ischemia. Similar systemic activation of both cellular and humoral immune responses has been observed in other types of ischemic lesions, including myocardial ischemia [39], suggesting that this may be a common systemic response to local tissue inflammation.

The absence of any differences between left versus right ischemic lesions in modulation of spleen cell number and function in the MCA occlusion model is contrary to previous findings where unilateral cortical lesions in animals produced distinct left/right cerebral asymmetries, mostly with suppressive/enhancing effects respectively [2,4,7,34,42,43,48]. The reasons for these discrepancies are not due to species differences, since previous rodent work was performed both in mouse [43,48] and rat [4,34], but they are probably related to the specific brain regions that are affected. Indeed, dysregulation of CNS by lesioning specific areas of the brain either suppressed or enhanced a variety of immune parameters. Destructive lesions of the anterior

hypothalamus lead to a decrease in spleen and thymus cell numbers, and to decreased mitogen-induced proliferative responses of spleen lymphocytes, while lesions to the hippocampus or the amygdala resulted in increased mitogenic responsiveness of spleen lymphocytes [8,53]. These observations, together with those of our own study indicate that ischemic as well as mechanical lesions affecting subcortical structures such as anterior hypothalamus, hippocampus and amygdala modulate the immune response that occurs when the neocortex has been damaged, and will result in immune activation in the periphery. The same reasons probably hold true for previously reported studies in stroke patients, which suggest that alterations of immune responses in the periphery may be lateralized [29,55,61,62]. In at least one of these clinical studies [55], only subjects with cortical lesions were selected, excluding subcortical damage. Therefore, we would postulate that the combination of cortical and subcortical lesions, together with the sparing of the hypothalamus despite ischemia of the amygdala leads to an activation of the immune system in both left and right infarctions. The lack of autonomic lateralization further supports this theory. Indeed, when we look at blood pressure response to occlusion, and at plasma NE levels determined at the same time points as the immunologic parameters, we did not find obvious differences in the autonomic response of left versus right ischemia. Previous experimental and clinical studies reporting hemispheric lateralization of immune control fail to measure the effects on autonomic parameters [4,34,37,43,48,55,61]. However, detailed studies of autonomic consequences of experimental stroke have found increased plasma NE levels only in rats given right MCA occlusion [21]. In the latter study, a permanent MCA occlusion model was used (versus transient MCA occlusion in our study), and contrary to our study, acute changes in NE levels were determined throughout the 4-h period of occlusion, but not during reperfusion post-occlusion. More importantly, blood pressure was reduced and maintained at 60 mm Hg in our model, while it was left uncontrolled in the previous study [21], yielding differential arterial pressure responses in left and right ischemia groups in that study. These differences in the stroke model, among others, can explain the discrepancies between the two studies in regulation of plasma NE levels during cerebral ischemia. Conflicting data have been reported in clinical studies concerning differential left/right cerebral hemispheric effects on heart rate responses to acute stroke [30,33,50], and to unilateral hemispheric inactivation produced by intracarotid amobarbital injection in epilepsy patients [27,65]. Clearly, cerebral asymmetries in regulation of autonomic function are not present in all settings, and lateralization of stroke-induced immune responses and autonomic responses may

critically depend on the specific localization of the ischemic lesions in each hemisphere. Interestingly, in the studies of Tarkowski et al. [61,62], a systemic increase of cutaneous delayed-type hypersensitivity reaction was noted in stroke patients in the chronic phase of the disease, who had subcortical brain lesions as a cause of their motor deficits, further supporting the idea that subcortical lesions may modulate the influence of the neocortex on immune responses.

Several pathways are involved in the reciprocal communication between the CNS and the immune system. The immune system signals the CNS through cytokines and chemokines [6,38], while the CNS signals the immune system through two primary pathways: (a) the neuroendocrine system with production of glucocorticoids [63]; and (b) the sympathetic nervous system with noradrenergic innervation of lymphoid organs, release of NE, and stimulation of beta 2-adrenergic receptors expressed on immune cells [32]. The mechanisms involved in the systemic immune response to dysregulation of CNS by cerebral ischemia are still unknown, although the neuroendocrine and/or sympathetic nervous systems may play a role. It is noteworthy that the immune changes induced by electrolytic lesioning of specific CNS regions are not mediated by changes in corticosterone levels, implying that this neuroendocrine hormone is not involved [52]. Also, in the surgically-induced myocardial ischemia model, the decreased spleen T and B cell numbers, and increased splenocyte responsiveness to the mitogen Concanavalin A were shown to be independent of beta-adrenergic stimulation with exogenous catecholamine administration, suggesting that the sympathetic nervous system is not involved in these changes [39]. However, in these models, as in our stroke model, the levels of endogenous catecholamines in the spleen are not assessed. It is likely that further studies using NE turnover analysis may provide a better estimate of the dynamic changes in sympathetic nerve activity in the spleen of animals with cerebral ischemia.

The stroke model used in this study does have some shortcomings. Although the general size of the infarct is rather constant, the various structures affected may not be. Also, damage to the hypothalamus and amygdala is checked in this setting using a mapping technique, but without histological verification, it is impossible to be sure which structures are affected in each animal. We have not attempted to define the fate of spleen cells following CNS ischemia. Indeed, although the decrease in spleen leukocytes, especially that of CD8⁺ T cells, can be due to their infiltration into the ischemic lesions, shifts into other lymphoid and nonlymphoid tissues, as well as increased cell death, may play a role. Potential shifts peripherally are supported by

recent evidence from other studies indicating preferential localization of effector memory antigen-specific CD8⁺ T cells in tertiary nonlymphoid tissues in response to viral or bacterial infection, independently of the infectious agent and the infection route [36]. Dramatic redistribution of immune cells from lymphoid tissues to nonlymphoid tissues following an immune response have been described in other models, as well [35]. Whether splenic CD8⁺ T cells migrate to other tissues than to the brain in response to CNS ischemia remains to be established.

In conclusion, the findings of the present study indicate that cerebral ischemia is followed by a rapid efflux of leukocytes from the spleen, as well as a rapid and sustained stimulation of *in vitro* proliferative responses of spleen T and B lymphocytes to mitogens, further supporting a direct connection between CNS and immune system. The immune alterations induced by cerebral ischemia in the spleen appear independent of the side of the ischemic lesions. Future studies will elucidate the molecular mechanisms underlying ischemia-induced systemic activation of immune cell traffic and function, specific localization of effector T cells, and the relative contributions of cortical and subcortical brain regions in the control of the immune system in the periphery.

References

- [1] B. Arvin, L.F. Neville, F.C. Barone, G.Z. Feuerstein, The role of inflammation and cytokines in brain injury, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20 (1996) 445-452.
- [2] P. Bardos, D. Degenne, Y. Lebranchu, K. Biziere, G. Renoux, Neocortical lateralization of NK activity in mice, *Scand. J. Immunol.* 13 (1981) 609-611.
- [3] P. Barneoud, M. Le Moal, P.J. Neveu, Asymmetric distribution of brain monoamines in left- and right-handed mice, *Brain Res.* 520 (1990) 317-321.
- [4] P. Barneoud, P.J. Neveu, S. Vitiello, M. Le Moal, Brain neocortex immunomodulation in rats, *Brain Res.* 474 (1988) 394-398.
- [5] L. Belayev, O.F. Alonso, R. Busto, W. Zhao, M.D. Ginsberg, Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model, *Stroke* 27 (1996) 1616-1622.
- [6] E.N. Benveniste, Cytokine actions in the central nervous system, *Cytokine Growth Factor Rev.* 9 (1998) 259-275.
- [7] C. Betancur, P.J. Neveu, S. Vitiello, M. Le Moal, Natural killer cell activity is associated with brain asymmetry in male mice, *Brain Behav. Immun.* 5 (1991) 162-169.
- [8] W.H. Brooks, R.J. Cross, T.L. Rozman, W.R. Markesbery, Neuroimmunomodulation: neural anatomical basis for impairment and facilitation, *Ann. Neurol.* 12 (1982) 56-61.
- [9] R.J. Cross, W.R. Markesbery, W.H. Brooks, T.L. Roszman, Hypothalamic-immune interactions. I. The acute effects of anterior hypothalamic lesions on the immune response, *Brain Res.* 196 (1980) 79-87.
- [10] R.J. Cross, W.R. Markesbery, W.H. Brooks, T.L. Roszman, Hypothalamic-immune interactions: neuromodulation of natural killer activity by lesioning of the anterior hypothalamus, *Immunology* 51 (1984) 399-405.
- [11] B. Deleplanque, S. Vitiello, M. Le Moal, P.J. Neveu, Modulation of immune reactivity by unilateral striatal and mesolimbic dopaminergic lesions, *Neurosci. Lett.* 166 (1994) 216-220.
- [12] A.I. Esquifino, P.O. Castrillon, F. Chacon, R. Cutrera, D.P. Cardinali, Effect of local sympathectomy on 24-h changes in mitogenic responses and lymphocyte subset populations in rat submaxillary lymph nodes during the preclinical phase of Freund's adjuvant arthritis, *Brain Res.* 888 (2001) 227-234.

- [13] G.Z. Feuerstein, X. Wang, Animal models of stroke, *Mol. Med. Today* 6 (2000) 133-135.
- [14] K.E. Foulds, L.A. Zenewicz, D.J. Shedlock, J. Jiang, A.E. Troy, H. Shen, Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses, *J. Immunol.* 168 (2002) 1528-1532.
- [15] J.H. Garcia, K.F. Liu, Brain parenchymal responses to experimental focal ischemia: cellular inflammation. In: J. Kriegstein (Ed), *Pharmacology of Cerebral Ischemia*, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1996, pp. 379-384.
- [16] J.H. Garcia, S. Wagner, K.F. Liu, X.J. Hu, Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation, *Stroke* 26 (1995) 627-634.
- [17] N. Geschwind, A.M. Galaburda, Cerebral lateralization. Biological mechanisms, associations, and pathology: I. A hypothesis and a program for research, *Arch. Neurol.* 42 (1985) 428-459.
- [18] N. Geschwind, A.M. Galaburda, Cerebral lateralization. Biological mechanisms, associations, and pathology: II. A hypothesis and a program for research, *Arch. Neurol.* 42 (1985) 521-552.
- [19] N. Geschwind, A.M. Galaburda, Cerebral lateralization. Biological mechanisms, associations, and pathology: III. A hypothesis and a program for research, *Arch. Neurol.* 42 (1985) 634-654.
- [20] F. Gillardon, C. Lenz, W. Kuschinsky, M. Zimmermann, Evidence for apoptotic cell death in the choroid plexus following focal cerebral ischemia, *Neurosci. Lett.* 207 (1996) 113-116.
- [21] V.C. Hachinski, S.M. Oppenheimer, J.X. Wilson, C. Guiraudon, D.F. Cechetto, Asymmetry of sympathetic consequences of experimental stroke, *Arch. Neurol.* 49 (1992) 697-702.
- [22] K.M. Heilman and E. Valenstein (Eds), *Clinical Neuropsychology*, 3rd ed, Oxford University Press, New York, 1993, 752 pp.
- [23] J.K. Hill, L. Gunion-Rinker, D. Kulhanek, N. Lessov, S. Kim, W.M. Clark, M.P. Dixon, R. Nishi, M.P. Stenzel-Poore, F.P. Eckenstein, Temporal modulation of cytokine expression following focal cerebral ischemia in mice, *Brain Res.* 820 (1999) 45-54.
- [24] M. Horn, F. Seger, W. Schote, Neuron-specific enolase in gerbil brain and serum after transient cerebral ischemia, *Stroke* 26 (1995) 290-297.

- [25] K. Iken, S. Chheng, A. Fargin, A.C. Goulet, E. Kouassi, Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT_{1A} receptors, *Cell. Immunol.* 163 (1995) 1-9.
- [26] S. Jander, M. Kraemer, M. Schroeter, O.W. Witte, G. Stoll, Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15 (1995) 42-51.
- [27] H. Jokeit, I. Noerpel, E. Herbord, A. Ebner, Heart rate does not decrease after right hemispheric amobarbital injection, *Neurology* 54 (2000) 2347-2348.
- [28] H. Kato, K.Kogure, XH. Liu, T. Araki, Y Itoyama, Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat, *Brain Res.* 734 (1996) 203-212.
- [29] M. Kawaharada, K. Urasawa, [Immunological functions and clinical course of elderly patients with cerebrovascular diseases]. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*, 29 (1992) 652-660.
- [30] J. Klingelhofer, D. Sander, Cardiovascular consequences of clinical stroke, *Baillieres Clin. Neurol.* 6 (1997) 309-335.
- [31] P.M. Kochanek, J.M. Hallenbeck, Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke, *Stroke* 23 (1992) 1367-1379.
- [32] A.P. Kohm, V.M. Sanders, Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4⁺ T and B lymphocyte function *in vitro* and *in vivo*, *Pharmacol. Rev.* 53 (2001) 487-525.
- [33] J.T. Korpelainen, K.A. Sotaniemi, A. Mäkikallio, H.V. Huikuri, V.V. Myllylä, Dynamic behavior of heart rate in ischemic stroke, *Stroke* 30 (1999) 1008-1013.
- [34] G.J. La Hoste, P.J. Neveu, P. Modmede, M. Le Moal, Hemispheric asymmetries in the effects of cerebral cortical ablations on mitogen-induced lymphoproliferation and plasma prolactin in female rats, *Brain Res.* 483 (1989) 123-129.
- [35] C.R. Mackay, H. U.H. von Andrian, Memory T cells--Local heroes in the struggle for immunity, *Science* 291 (2001) 2323-2324.
- [36] D. Masopust, V. Vezys, A.L. Marzo, L. Lefrançois, Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue, *Science* 291 (2001) 2323-2324.

- [37] K.J. Meador, J.M. De Lecuona, S.W. Helman, D.W. Loring, Differential Immunologic effects of language-dominant and nondominant cerebral resection, *Neurology* 52 (1999) 1183-1187.
- [38] A. Mulla, J.C. Buckingham, Regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by cytokines, *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 13 (1999) 503-521.
- [39] D.R. Murray, S.M. Polizzi, T.J. Harris, A.S. Maisel, Myocardial ischemia alters immunoregulatory cell traffic and function in the rat independent of exogenous catecholamine administration, *J. Neuroimmunol.* 71 (1996) 107-113.
- [40] S. Nagahiro, S. Goto, K. Korematsu, M. Sumi, M. Takahashi, Y. Ushio, Disruption of the blood-cerebrospinal fluid barrier by transient cerebral ischemia, *Brain Res.* 633 (1994) 305-311.
- [41] P.J. Neveu, Lateralization and stress responses in mice: interindividual differences in the association of brain, neuroendocrine, and immune responses, *Behav. Genet.* 26 (1996) 373-377.
- [42] P.J. Neveu, P. Barneoud, O. Georgiades, S. Vitiello, P. Vincendeau, M. Le Moal, Brain neocortex influence on the mononuclear phagocyte system, *J. Neurosci. Res.* 22 (1989) 188-193.
- [43] P.J. Neveu, P. Barneoud, S. Vitiello, K.W. Kelley, M.A. Le Moal, Brain neocortex modulation of mitogen-induced interleukin 2, but not interleukin-1 production, *Immunol. Lett.* 21 (1989) 307-310.
- [44] P.J. Neveu, C. Betancour, P. Barneoud, S. Vitiello, M. Le Moal, Functional brain asymmetry and lymphocyte proliferation in female mice: effects of right and left cortical ablation, *Brain Res.* 550 (1991) 125-128.
- [45] P.J. Neveu, B. Deleplanque, S. Vitiello, F. Rouge-Pont, M. Le Moal, Hemispheric asymmetry in the effects of substantia nigra lesioning on lymphocyte reactivity in mice, *Int. J. Neurosci.* 64 (1992) 267-273.
- [46] J. Peeling, D. Corbett, M.R. Del Bigio, T. Hudzik, T.M. Campbell, G.C. Palmer, Rat middle cerebral artery occlusion: correlations between histopathology, T2-weighted magnetic resonance imaging, and behavioral indices, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 10 (2001) 166-177.
- [47] Z.C. Peng, C. Pietra, A. Sbarbati, L. Ziviani, X.B. Yan, F. Osculati, M. Bentivoglio, Induction of NADPH-diaphorase activity in the rat forebrain after middle cerebral artery occlusion, *Exp. Neurol.* 138 (1996) 105-120.

- [48] G. Renoux, K. Biziere, M. Renoux, J.M. Guillaumin, The production of T-cell-inducing factors in mice is controlled by the brain neocortex, *Scand. J. Immunol.* 17 (1983) 45-50.
- [49] T.G. Robinson, M. James, J. Youde, R. Panerai, J. Potter, Cardiac baroreceptor sensitivity is impaired after acute stroke, *Stroke* 28 (1997) 1671-1676.
- [50] T. Robinson, J. Potter, R. Panerai, Heart rate variability following ischemic stroke, *Stroke* 30 (1999) 2246-2247.
- [51] D.C. Rogers, C.A. Campbell, J.L. Stretton, K.B. Mackay, Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat, *Stroke* 28 (1997) 2060-2065.
- [52] T.L. Roszman, W.H. Brooks, Neural modulation of immune function, *J. Neuroimmunol.* 10 (1985) 59-69.
- [53] T.L. Roszman, R.J. Cross, W.H. Brooks, W.R. Markesbery, Neuroimmunomodulation: Effects of neural lesions on cellular immunity. In: R. Guillemin, T Melnechuk (Eds), *Neural Modulation of Immunity*, Raven Press, New York, 1985, pp. 95-109.
- [54] T.L. Roszman, J.C. Jackson, R.J. Cross, M.J. Titus, W.R. Markesbery, W.H. Brooks, Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function, *J. Immunol.* 135 (1985) 769s-772s.
- [55] A. Saint-Marseille, E. Kouassi, G. D'Angelo, P. Laplante, S. Chheng, M.L. Trouvé, F. Gilbert, D. Geadah, C.M.J. Braun, Opposed left and right neocortical involvement in the immune response indexed by cerebrovascular accidents in humans. TENNET VII: Theoretical and experimental neuropsychology. Montreal, Quebec, Canada, August 14-16, 1996, Proceedings and abstracts, *Brain Cogn.* 32 (1996) 173-175.
- [56] M. Schroeter, S. Jander, O.W. Witte, G. Stoll, Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion, *J. Neuroimmunol.* 55 (1994) 195-203.
- [57] S.L. Stevens, J. Bao, J. Hollis, N.S. Lessov, W.M. Clark, M.P. Stenzel-Poore, The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice, *Brain Res.* 932 (2002) 110-119.
- [58] G. Stoll, S. Jander, M. Schroeter, Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions, *Prog. Neurobiol.* 56 (1998) 149-171.
- [59] G.R. Sutherland, G.A. Dix, R.N. Auer, Effect of age in rodent models of focal and forebrain ischemia, *Stroke* 27 (1996) 1663-1667.

- [60] L.W. Swanson (Ed.), *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*, 2nd Edition, Elsevier, Amsterdam, 1998, 267 pp.
- [61] E. Tarkowski, C. Blomstrand, A. Tarkowski, Stroke induced lateralization of delayed-type hypersensitivity in the early and chronic phase of the disease: a prospective study, *J. Clin. Lab. Immunol.* 46 (1995) 73-83.
- [62] E. Tarkowski, P. Ekelund, A. Tarkowski, Enhancement of antigen-specific T-cell reactivity on the affected side in stroke patients, *J. Neuroimmunol.* 34 (1991) 61-67.
- [63] J.I. Webster, L. Tonelli, E.M. Sternberg, Neuroendocrine regulation of immunity, *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 125-163.
- [64] S. Yamagami, M. Tamura, M. Hayashi, N. Endo, H. Tanabe, Y. Katsuura, K. Komoriya. Differential production of MCP-1 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the ischemic brain after transient focal ischemia in rats, *J. Leukoc. Biol.* 65 (1999) 744-749.
- [65] E.Y. Zamrini, K.J. Meador, D.W. Loring, F.T. Nichols, G.P. Lee, R.E. Figueroa, W.O. Thompson, Unilateral cerebral inactivation produces differential left/right heart rate responses, *Neurology* 40 (1990) 1408-1411.
- [66] C. Zhu, R.N. Auer, Graded hypotension and MCA occlusion duration: effect in transient focal ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15 (1995) 980-988.

Table 1
Physiological parameters in sham-operated and ischemia rats

Parameters	Sham			Ischemia		
	n	Mean	± SEM	n	Mean	± SEM
Blood pressure (mm Hg)	109	67.83	± 0.93	60	59.14	± 0.22***
Body temperature (°C)	109	37.13	± 0.01	60	37.14	± 0.02
P _{CO2} (pre-surgery) (mm Hg)	106	35.41	± 0.45	51	37.03	± 0.71
P _{CO2} (end of surgery) (mm Hg)	106	38.69	± 0.63	51	38.01	± 0.87
P _{O2} (pre-surgery) (mm Hg)	106	127.92	± 2.03	51	128.46	± 3.15
P _{O2} (end of surgery) (mm Hg)	106	124.60	± 1.97	51	119.05	± 4.94
Glucose (mmol/L)	109	9.59	± 0.21	60	9.80	± 0.23
pH	108	7.39	± 0.00	59	7.39	± 0.01

For each parameter, data from animals with left or right MCA occlusion were pooled since no statistical difference was observed between hemispheres. *** $p < 0.001$ as compared to sham-operated rats.

Table 2

Plasma NE concentrations in sham and ischemia rats at different reperfusion times post-ischemia

Reperfusion time (days)	NE concentration (pmol/L)	
	Sham (n) ^a	Ischemia (n)
0	42.88 ± 11.83 (20)	47.20 ± 12.07 (10)
2	55.45 ± 26.04 (26)	76.05 ± 26.55 (10)*
7	58.56 ± 20.22 (20)	52.14 ± 33.78 (10)

^aData are the mean ± SEM for the indicated number (n) of rats in each group. Results from rats with left or right MCA occlusion were pooled since no statistical difference was found between hemispheres. * $p = 0.04$, ischemia versus sham controls.

Table 3

Infarct volume of the ischemic hemisphere at different reperfusion times post-ischemia

Reperfusion time (days)	% Infarct volume (Mean±SEM)			
	Left MCA occlusion		Right MCA occlusion	
	Sham (n) ^a	Ischemia (n)	Sham (n)	Ischemia (n)
0	0 ± 0 (10)	0 ± 0 (5)	0 ± 0 (10)	0 ± 0 (5)
2	0.45 ± 0.44 (15)	29.87 ± 4.05*** (5)	0 ± 0 (11)	29.14 ± 2.80*** (5)
7	0.17 ± 0.17 (10)	29.21 ± 4.16*** (6)	0.90 ± 0.90 (10)	34.16 ± 2.27*** (5)
14	0 ± 0 (10)	20.66 ± 4.95*** (9)	0 ± 0 (11)	20.89 ± 5.57*** (6)
28	0 ± 0 (11)	12.51 ± 2.44*** (6)	0.64 ± 0.64 (11)	18.66 ± 3.60*** (7)

^aData are the mean ± SEM for the indicated number (n) of rats in each group. *** $p < 0.001$ as compared to corresponding sham controls.

Table 4

Neurological outcome following ischemia induced by MCA occlusion in Wistar rats

Reperfusion time (days)		Focal deficits ^a		Sensorimotor evaluation ^a			
		n	Mean ±SEM	n	Sensory Mean ±SEM	Motor Mean ±SEM	Sensorimotor Mean ±SEM
2	Sham	26	0.19 ±0.19	26	98.71 ±1.28	97.90 ±2.10	98.07 ±1.92
	Ischemia	10	3.70 ±0.15***	8	66.66 ±0.00***	69.31 ±4.84***	68.75 ±3.80***
7	Sham	19	0.00 ±0.00	20	99.33 ±1.67	100.00 ±0.00	99.64 ±0.36
	Ischemia	11	3.59 ±0.21***	11	69.69 ±5.42***	71.07 ±4.56***	70.77 ±4.35***
14	Sham	21	0.00 ±0.00	21	100.00 ±0.00	99.13 ±0.60	99.31 ±0.47
	Ischemia	16	2.84 ±0.15***	16	66.66 ±0.00***	79.54 ±2.56***	76.78 ±2.01***
28	Sham	22	0.09 ±0.09	22	98.48 ±1.51	100.00 ±0.00	99.67 ±0.32
	Ischemia	13	2.80 ±0.17***	13	64.10 ±2.56***	88.11 ±2.16***	82.96 ±1.72***

^aFocal deficits were measured by using a scale adapted from Rogers et al [51], and data were analyzed with a Mann-Whitney test, while sensorimotor evaluation was performed with a scale adapted from Garcia et al [16] and analyzed with ANOVA. Results from rats with left or right MCA occlusion were pooled since no statistical difference was found between hemispheres. *** $p < 0.001$ as compared to sham-operated rats.

Table 5

Lack of changes of the percentage of spleen CD5⁺-CD4⁺ T cells, HLA class II⁺ cells, and ED1⁺ macrophages after MCA occlusion

Group	Percent positive cells ^a		
	CD5 ⁺ -CD4 ⁺	MHC class II ⁺	ED1 ⁺
Sham	25±6 (n=107)	38±8 (n=109)	13±7 (n=109)
Ischemia	25±6 (n=60)	39±7 (n=60)	14±8 (n=60)

^aData are the mean ± SEM for the indicated number (n) of rats. Results from rats with left or right MCA occlusion and at different times of reperfusion were pooled since no statistical difference was found between hemispheres, and between times of reperfusion.

Table 6

Augmentation of *in vitro* proliferation of mitogen-activated spleen T and B lymphocytes following cerebral ischemia

Mitogen	Proliferation Index ^a		Change (%) ^b	<i>p</i> value ^c
	Sham (n=106)	Ischemia (n=56)		
PHA	10.83 ± 1.35	18.88 ± 2.06	+ 74	0.003**
PWM	60.71 ± 3.89	86.94 ± 6.59	+ 37	0.024*
LPS+DxS	8.70 ± 0.88	15.22 ± 2.13	+ 75	<0.001***
PMA+Iono	33.97 ± 2.73	47.70 ± 4.21	+ 40	0.011*

^aProliferation index was calculated by dividing the number of cpm in the presence of mitogen by the number of cpm in the presence of culture media. Each culture was performed in sextuplicate, and data are the mean ± SEM of 106 (sham) or 56 (ischemia) rats.

^bThe percentage of change was given by the ratio of the proliferation index of ischemia rats to that of sham animals.

^c*p* values indicating statistical differences between ischemia and sham-operated rats. There was no difference related to the side of ischemia, nor to the time of reperfusion.

Figure Legends

Fig. 1. Kinetics of weight gain following cerebral ischemia. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ ischemia rats compared to corresponding sham.

Fig. 2. Relative distribution of cortical and subcortical lesions after left (A) or right (B) MCA occlusion. The number of ischemic animals was identical to that reported in Table 3. Interindividual variabilities of cortical and subcortical infarct volumes are similar to those reported for total infarcts in Table 3, and are omitted here.

Fig. 3. Kinetics of cerebral ischemia-induced changes in spleen cell number. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ ischemia rats compared to corresponding sham.

Fig. 4. Time-dependent effects of cerebral ischemia on the percentage of spleen $CD8^+$ T cells (A), and on CD4/CD8 ratio (B). $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells were detected by double labelling with an anti-CD5 antibody (directed against T cells) in conjunction with anti-CD4 or anti-CD8 antibodies, respectively, and analysis was performed by flow cytometry. $***p < 0.001$ comparing ischemia rats to corresponding sham.

Figure 1

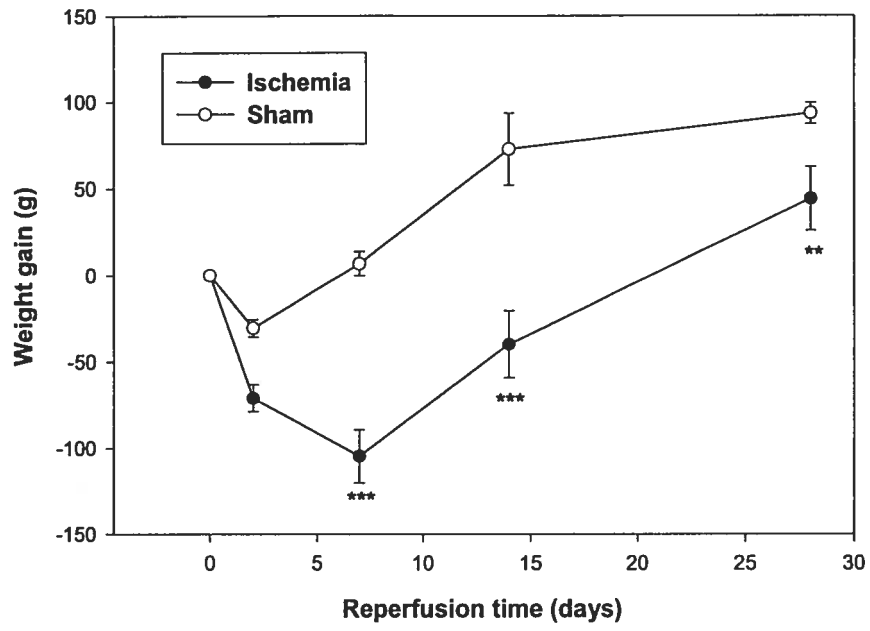


Figure 2

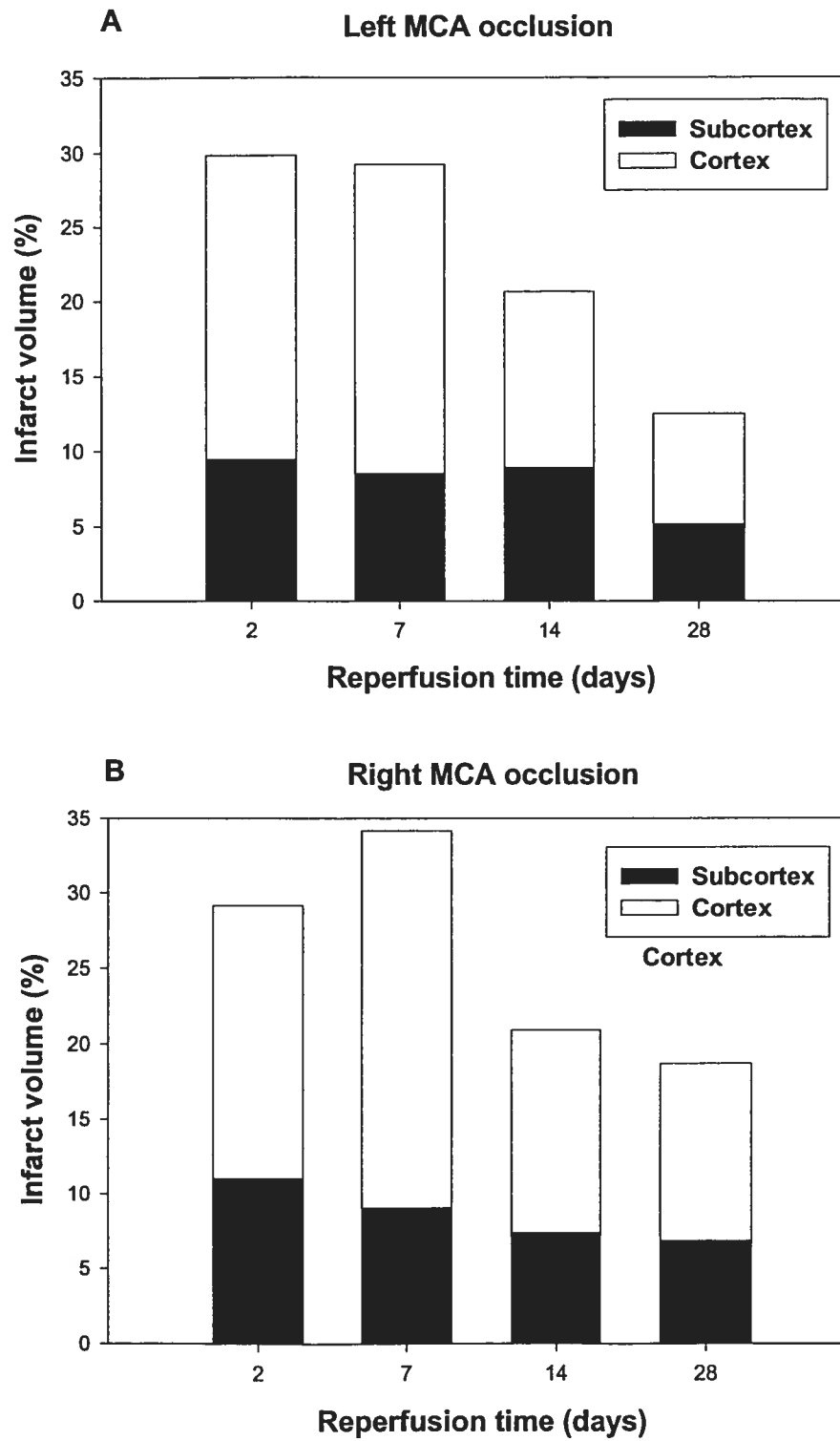


Figure 3

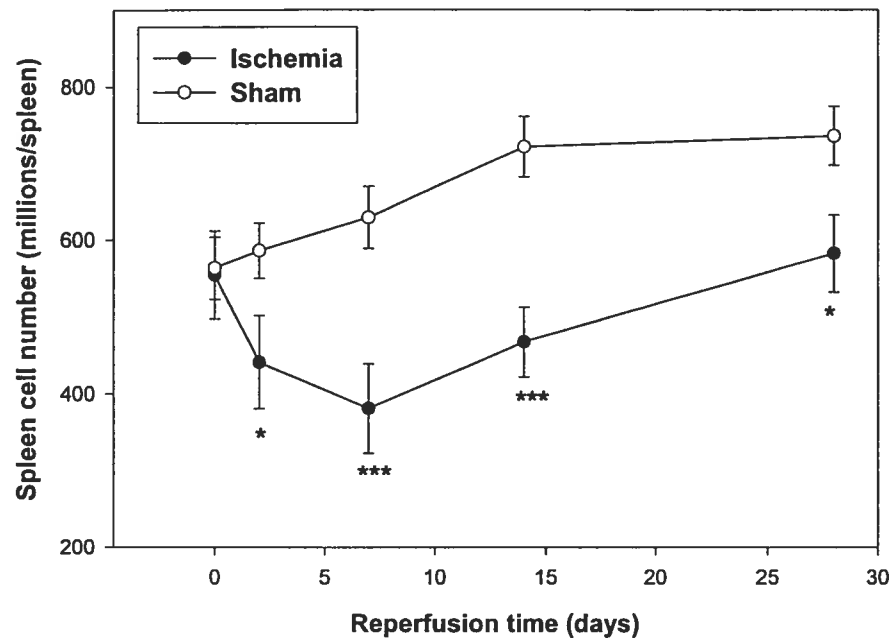
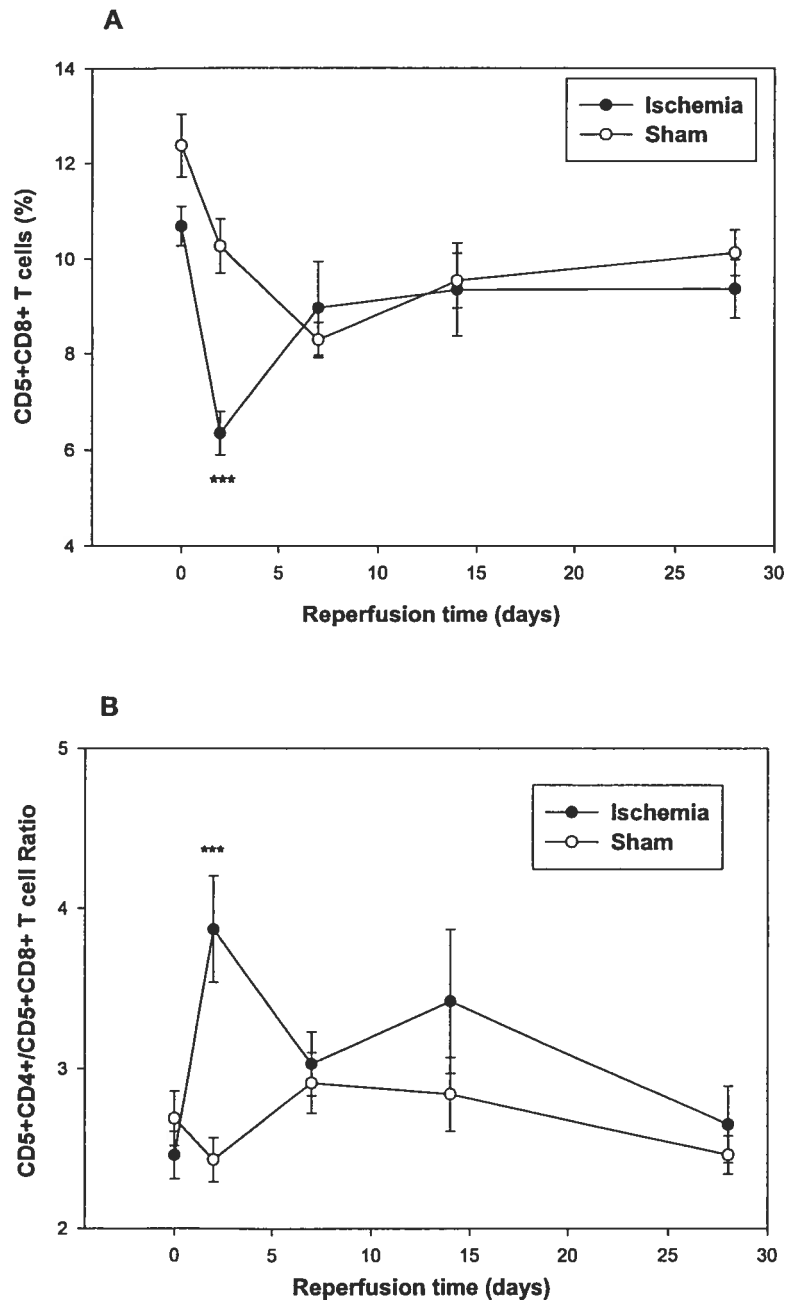


Figure 4



TROISIÈME PARTIE
DISCUSSION GÉNÉRALE

CHAPITRE 11

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans ce chapitre, nous discuterons d'abord nos résultats sur les variations des paramètres physiologiques en fonction du temps et leur importance en tenant compte des recommandations internationales dans ce domaine. Nous porterons, ensuite, notre attention sur l'influence de l'ischémie cérébrale sur l'homéostasie de l'oxygène en périphérie. Les changements des niveaux d'oxygène en périphérie nous amèneront à discuter leurs conséquences sur les concentrations plasmatiques de l'EPO ainsi que leurs effets sur l'érythropoïèse. Par la suite, nous discuterons l'expression des cytokines pro-inflammatoire que nous avons mesurées dans le système nerveux central et en périphérie, et l'effet de l'ischémie cérébrale sur les leucocytes. Nous tenterons d'expliquer les raisons de l'absence d'asymétrie cérébrale des changements induits par l'ischémie cérébrale sur les paramètres hématologiques et immunologiques ainsi que sur le système nerveux autonome. Nous identifierons les limites de nos expériences et nous conclurons en suggérant des études futures pour élucider les mécanismes impliqués dans les perturbations induites par l'ischémie cérébrale dans l'homéostasie de l'oxygène et la réponse inflammatoire en périphérie.

11.1. Évaluations pathophysiologiques, histologiques et neurologiques à court et à long terme dans notre modèle animal d'AVC ischémique

Les expériences que nous avons réalisées pour évaluer l'effet de l'ischémie cérébrale aiguë sur l'homéostasie de l'oxygène et les marqueurs de l'inflammation systémique nécessitaient un modèle animal approprié. Nous avons décidé de recourir au modèle d'occlusion transitoire de l'ACM suivie de reperfusion chez le rat Wistar pour différentes raisons. En effet, ce modèle est bien accepté par la communauté scientifique et il a été reconnu par un comité d'experts du milieu académique et de l'industrie pharmaceutique comme étant celui qui reproduit le mieux la maladie observée chez l'humain (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, 1999). De plus, le modèle d'occlusion transitoire de l'ACM nous permet d'étudier l'effet de la reperfusion qui

pourrait survenir chez l'humain, soit spontanément, soit après l'administration de médicaments thrombolytiques (rt-PA).

Le consensus actuel reconnaît deux critères essentiels d'évaluation dans les modèles expérimentaux d'AVC, peu importe l'espèce et les paramètres pharmacologiques; il s'agit du volume de l'infarctus et de la récupération fonctionnelle. De plus, il est essentiel de surveiller ces critères à court et à long terme. La pratique courante des études pré-cliniques consistant à surveiller les animaux pendant une période maximale de 24 heures (ou moins chez de gros animaux) a maintes fois donné des résultats «positifs» prématurés, les bienfaits initiaux disparaissant souvent avec le temps (Waltyssoin et al., 1994). La récupération fonctionnelle est le critère d'évaluation clé dans les études cliniques parce que la taille des lésions de l'AVC ne correspond pas toujours aux déficits fonctionnels chez l'humain. Par conséquent, dans les études pré-cliniques, il faut insister plus sur la fonction que sur les observations histologiques. Dans nos expériences, nous avons mesuré le volume de l'infarctus et la récupération fonctionnelle à court terme (≤ 24 heures) et à long terme (jusqu'à 28 jours). Nous avons obtenu une corrélation entre les déficits moteurs ($r = -0,496$, $p < 0,001$) ou sensorimoteurs ($r = -0,461$, $p < 0,001$) et le volume de l'infarctus. La corrélation observée entre la condition clinique et la taille de l'infarctus suggère que les échelles utilisées pour mesurer le déficit sensorimoteur reflètent la taille et la gravité de l'infarctus. Des déficits sensoriels ont facilement été mis en évidence au moyen des échelles cliniques, mais ils n'étaient pas en corrélation avec le volume de l'infarctus ($r = -0,063$, $p < 0,675$). Par exemple, de petites lésions thalamiques peuvent entraîner de profondes anomalies sensorielles. De plus, le déficit sensoriel ne représente qu'une faible proportion de l'atteinte globale et bien sûr est, plus subtil et plus difficile à évaluer lors de l'examen clinique.

Chez les animaux sacrifiés à 7 jours ou avant, la taille de l'infarctus était supérieure à celle des infarctus observés par Zhu et Auer (1995) pour la même TA (60 mm Hg) et la même durée d'occlusion (60 minutes), c'est à dire environ 30 ± 5 % de l'hémisphère ipsilatéral par rapport à 11 ± 8 %. Cette différence pourrait être due au fait que nous avons utilisé un fil enrobé de poly-L-lysine, qui favorise l'adhésion de la suture à l'endothélium vasculaire adjacent (Belayev et al., 1996). Les volumes d'infarctus qui représentaient environ 30 % du volume total des hémisphères 2-7 jours après ischémie, correspondaient à un déficit neurologique modéré à grave ou à un niveau ≥ 3 à l'échelle utilisée par Rogers et

collaborateurs (1997). Il y avait peu de variabilité dans les volumes d'infarctus pour le même degré d'atteinte neurologique, et le modèle a été jugé fiable. Chez les animaux sacrifiés après 14 et 28 jours, les volumes d'infarctus étaient plus modestes et les déficits neurologiques n'étaient que légers à modérés (niveau ≤ 3). Cette observation reflète la cicatrisation et la rétraction qui se produisent avec le temps. La réduction du déficit moteur avec le temps est probablement attribuable à la plasticité du cerveau et à la capacité du tissu cérébral contigu d'assurer certaines des fonctions du tissu infarci (Nadareishvili et Hallenbeck, 2003). De fait, ce type de récupération est observé dans des modèles similaires (Palmer et al., 2001).

Nous avons fait le suivi de la tension artérielle durant la période ischémique. Nous avons maintenu la tension artérielle à un niveau uniforme (60 mm Hg) quelque soit le côté de l'occlusion de l'ACM. Le modèle que nous avons utilisé produit des lésions corticales et sous-corticales et tend à épargner l'hypothalamus (Gillardon et al., 1996; Peng et al., 1996; Zhu et Auer, 1995). Le volume de l'infarctus dépend à la fois du niveau d'hypotension et de la durée de l'occlusion de l'ACM (Zhu et Auer, 1995). De plus, la combinaison de l'occlusion et de la réduction de la TA provoque un infarctus de manière régulière et prévisible et peut produire une atteinte comparable à celle d'agressions normotensives plus longues (p. ex., 2 heures) (Corbett et al., 2000; Zhu et Auer, 1995). Nous avons comme objectif de produire un infarctus de taille modérée sans les effets indésirables importants qui sont courants avec les ischémies plus longues (p. ex., crises convulsives, mortalité élevée). Nous avons utilisé une occlusion de 60 minutes parce que les résultats préliminaires d'une étude pilote (Gendron et al., 1999) indiquaient que le taux de mortalité était acceptable (25-30 %). Des interventions plus longues (p. ex., 90 minutes, 120 minutes) à une TA de 60 mm Hg étaient associées à une morbidité excessive. Le volume de l'infarctus exprimé en pourcentage chez des animaux sacrifiés 2 et 7 jours après la reperfusion était modéré (20-30 %).

La latéralisation cérébrale des conséquences immunologiques de l'AVC a été étudiée en provoquant une ischémie dans les hémisphères gauche et droit. Il était alors important de s'assurer que le volume des lésions unilatérales était comparable après AVC gauche ou droit. Des volumes d'infarctus cérébraux non homogènes auraient pu causer une disparité dans les résultats pouvant nous amener à conclure de manière erronée à un phénomène de latéralisation. En fait, aucune différence n'a été décelée entre les deux hémisphères quant au volume des infarctus (y compris le volume des infarctus corticaux et

sous-corticaux), ce qui confirme la validité du modèle d'AVC unilatéral pour étudier la latéralisation cérébrale du contrôle de la réponse immunitaire.

Les données de notre étude à long terme démontrent que le poids corporel a diminué rapidement au cours des 14 jours suivant l'AVC (Gendron et al., 2002). Par la suite, la perte pondérale est devenue moins prononcée et le poids s'est remis à augmenter pour finalement dépasser la valeur initiale au 28^e jour (Gendron et al., 2002). D'autres études ont également montré d'importantes diminutions du poids corporel après un AVC (Chopp et al., 1994; Jiang et al., 1997). Dans notre modèle, la perte de poids est très probablement un indice indirect des dommages au cerveau. Une étude effectuée par Dittmar et ses collaborateurs (2003) confirme nos propres observations et elle montre que l'occlusion de la carotide externe peut avoir un effet négatif sur le développement des rats ayant subi une occlusion de l'ACM. Chez presque la moitié des rats évalués dans cette étude, une atteinte ischémique du territoire ipsilatéral de l'ACM, y compris de la musculature temporale, linguale et pharyngée, a été décelée par IRM (Dittmar et al., 2003). Les animaux qui avaient subi une ischémie du territoire de l'ACM présentaient un retard de développement et une moins bonne récupération de la fonction motrice. Il est possible qu'après un AVC, les animaux soient incapables d'avalier ou d'aller chercher leur nourriture et leur eau ou souffrir d'une lésion aux centres de la faim (Garcia et Liu., 1996). Il est également possible que les animaux soient trop somnolents pour s'alimenter, mais cette explication ne s'appliquerait qu'à une courte période après l'ischémie. On a rapporté que l'hypoxie systémique pouvait provoquer une baisse du poids corporel. Celle-ci pourrait être le résultat de multiples altérations de la fonction cardiovasculaire, de la production hormonale, du métabolisme énergétique et d'autres aspects de la physiologie des cellules et de l'organisme (Wang et al., 1995).

11.2. Hypoxémie induite par l'ischémie cérébrale aiguë chez le rat

Des études antérieures utilisant le modèle d'occlusion transitoire de l'ACM chez le rat Wistar n'ont révélé aucune différence dans la PaO₂ jusqu'à 4 heures après la reperfusion, mais aucune autre mesure n'a été effectuée après cet intervalle de 4 heures (Yoshimoto et al., 2002). Nos études, en fonction du temps, couvrant des périodes allant jusqu'à 24 h après reperfusion indiquent clairement que des rats ayant subi une occlusion de l'ACM présentaient une hypoxémie modérée (SaO₂ ≤ 80 %; PaO₂ ≤ 60 %) de 6 à 24 heures après la reperfusion (Gendron et al., 2004b). Les diminutions de la SaO₂ et de la

PaO₂ observées chez des animaux ischémiques nuisent à l'apport de l'oxygène aux tissus (Weinberger, 1998), et peuvent aggraver les lésions ischémiques cérébrales (Miyamoto et Auer, 2002).

L'hypoxie systémique post-AVC démontrée dans notre étude chez les rats soumis à une occlusion de l'ACM confirme les observations cliniques antérieures chez des patients ayant présenté un AVC (Roffe et al., 2003; Sulter et al., 2000). En effet, dans une étude où des patients présentant un AVC aigu avec hémiparésie ont été suivis par oxymétrie pulsée en continu, Sulter et ses collaborateurs (2000) ont observé que plus de la moitié des patients présentaient un déclin de la saturation en oxygène, souvent plusieurs heures après l'admission, sans association apparente avec des difficultés respiratoires. Nos résultats viennent donc supporter la pertinence du modèle animal pour l'étude des complications hypoxiques post-AVC.

Les causes de l'hypoxie consécutive à l'AVC peuvent être multiples. Elles comprennent des altérations de la régulation centrale de la respiration, une faiblesse des muscles respiratoires du côté atteint d'hémiplégie et l'apnée du sommeil (Roffe, 2001). La fonction respiratoire est régulée par différents éléments du cerveau qui s'étendent du cortex cérébral jusqu'aux noyaux ponto-médullaires et qui pourraient avoir été lésés dans notre modèle produisant des infarctus volumineux. Des régions du cortex, telles que la partie antérieure de la 5^e circonvolution temporale, le lobe temporal, l'insula et le gyrus limbique, interviennent aussi dans la régulation de la respiration (Vingerhoets et Bogousslavsky, 1994). Le cortex exerce un effet inhibiteur sur la respiration au repos, et une lésion ou un infarctus entraîne une augmentation de la fréquence respiratoire (Roffe, 2001). Par exemple, la respiration de Cheyne-Stokes est très souvent observée avec des lésions corticales bilatérales, mais elle peut survenir en présence de lésions unilatérales ou même en l'absence de lésions cérébrales dans le contexte d'une maladie cardiovasculaire (Lee et al., 1974; Vingerhoets et Bogousslavsky, 1994; Yajima et al., 1994). Les lésions du tronc cérébral diminuent la fréquence respiratoire et les lésions du bulbe rachidien provoquent de l'apnée (Roffe, 2001). Certaines structures de la substance blanche peuvent également avoir un effet sur la régulation de la fonction respiratoire. En effet, van Dijk et ses collaborateurs (2004) ont démontré que de faibles valeurs en SaO₂ chez les patients souffrant de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) étaient associées à des lésions de la substance blanche périventriculaire.

Certaines complications médicales de l'AVC telles que l'aspiration, les infections des voies respiratoires et les embolies pulmonaires peuvent également nuire à l'oxygénation (Roffe, 2001). Dans notre modèle, l'hypoxie n'est probablement pas due à une pneumonie par aspiration ou à une embolie pulmonaire étant donné que les animaux n'étaient ni infectés ni immobiles. La faible PaO_2 associée à une PaCO_2 légèrement accrue indique plutôt un problème de ventilation, telle qu'une faiblesse des muscles respiratoires, un dysfonctionnement respiratoire d'origine centrale ou une apnée du sommeil. Il est également possible que les animaux soumis à une occlusion de l'ACM aient répondu à l'anesthésie par une dépression respiratoire plus marquée en raison de l'atteinte cérébrale sous-jacente. On sait que la réponse immédiate à l'hypoxie comporte une hyperventilation réflexe faisant intervenir les chémorécepteurs du glomus carotidien (Lahiri et al., 2001). La manipulation du glomus carotidien a été la même chez les animaux soumis à l'occlusion et chez les animaux témoins, ce qui élimine la possibilité qu'une lésion des chémorécepteurs soit à l'origine de la différence observée dans la PaO_2 entre les deux groupes.

Puisque l'hypoxie peut aggraver l'atteinte ischémique cérébrale, une oxygénation adéquate est souvent recommandée chez toutes les victimes d'un AVC aigu, qu'elles soient intubées ou non (Bernstein et Hemphill, 2001). Cependant, l'administration d'oxygène chez les patients avec un AVC est controversé à cause de la production de radicaux libres (Gonzalez et Wood, 2001). Flynn et Auer (2002) ont étudié l'effet d'une hyperoxygénation appliquée pendant et après une ischémie transitoire normoglycémique et normothermique provoquée par occlusion de l'ACM chez le rat. La hausse de la PaO_2 , de 98.9 ± 4.0 à 312.2 ± 48.8 mm Hg, durant l'ischémie ou la reperfusion a amélioré la fonction neurologique et a réduit la nécrose corticale. L'administration continue d'oxygène a donné les meilleurs résultats, et il n'y avait aucune indication de lésions de reperfusion dues à l'oxygène. De plus, Rosenthal et ses collaborateurs (2003) ont montré que l'oxygène hyperbare procurait une neuroprotection en inhibant la mort neuronale et en améliorant les fonctions neurologiques après un arrêt cardiaque et une réanimation chez le chien. Les effets de l'oxygène hyperbare sur les activités des enzymes anti-oxydantes et oxydantes pourraient expliquer ses effets inhibiteurs sur la mort neuronale et le déficit neurologique après une ischémie cérébrale. Toutefois, la possibilité d'une aggravation de l'atteinte cérébrale (Aronowski et al., 1997) découlant d'une augmentation des effets des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Bacon et al., 1996; Carney et Floyd., 1991; Flamm et al., 1978) demeure une source considérable de préoccupation et d'incertitude lorsqu'une

oxygénothérapie est utilisée. L'utilisation du modèle animal d'occlusion transitoire de l'ACM s'avère donc un outil acceptable dans les travaux futurs pour élucider les risques et les bénéfices associés à l'oxygénothérapie dans les cas d'hypoxémie post-ischémie cérébrale.

11.3. Érythropoïétine et érythropoïèse après ischémie cérébrale

L'hypoxie est le principal stimulus de la production d'EPO tant dans les tissus périphériques que dans le cerveau (Buemi et al., 2002; Jelkmann, 1992; Semenza, 1994). Nous avons montré que chez les rats soumis à une occlusion de l'ACM, l'EPO plasmatique augmente six heures après la reperfusion, et cette hausse est suivie d'un retour vers les valeurs normales après 18-24 heures de reperfusion. Le fait qu'il y ait une hausse transitoire des concentrations d'EPO en présence d'une hypoxémie persistante n'est pas étonnant. En fait, ce résultat concorde avec certaines observations antérieures. Eckhart et ses collaborateurs (1993) ont constaté que chez le rat sous hypoxie profonde, l'ARNm de l'EPO rénale et l'EPO sérique augmentaient en parallèle après environ 4 heures, atteignaient un maximum après 8 heures, puis déclinaient jusqu'à 32 heures. La baisse de la production d'EPO a lieu malgré le fait que l'hypoxie se poursuive, et il y a une relation exponentielle inverse entre la tension en oxygène et la réponse de l'EPO. De leur côté, Fried et ses collaborateurs (1970) ont montré que chez le rat, les concentrations plasmatiques d'EPO atteignaient leur maximum après 8 heures d'une hypoxie prolongée puis déclinaient jusqu'à devenir à peine décelables après 72 heures. Les facteurs responsables de la baisse de la concentration d'EPO en présence d'une hypoxie persistante ne sont pas entièrement compris, mais une adaptation cellulaire à l'hypoxie pourrait en être la cause (Czyzyk-Krzeska, 1997; Eckart et al, 1993;).

L'EPO est produite principalement par les reins en réponse à l'hypoxie, et elle amène les précurseurs de la lignée érythrocytaire à produire un plus grand nombre d'érythrocytes matures, augmentant ainsi la capacité de transport de l'oxygène (Erslev et al., 1989; Jelkmann, 1994). L'augmentation rapide des érythrocytes que nous avons observée dans notre étude (deux-sept jours après reperfusion) concorde bien avec les effets connus de l'hypoxémie et de la hausse de l'EPO sur l'érythropoïèse chez le rat (Fried et al., 1970; Kalaidjieva, 1998; Shimizu et al., 1994). Ainsi, dans des études antérieures portant sur la réponse hématologique à une hypoxie aiguë, chronique ou répétée, on a constaté que

la hausse de l'hématocrite était déjà significative au 2^e jour et qu'elle se poursuivait, dans la plupart des cas, jusqu'au 14^e jour (Kalaidjieva et al., 1998; Shimizu et al., 1994). L'augmentation la plus importante se produit au cours des sept premiers jours, puis le rythme ralentit. De plus, lors d'une hypoxie prolongée, le nombre de réticulocytes commence à augmenter après deux jours, atteint un maximum après quatre jours et demeure à ce niveau pendant sept jours (Fried et al., 1970). Dans notre étude, les hausses maximales de l'EPO plasmatique, du nombre d'érythrocytes et de l'hématocrite chez les rats soumis à une occlusion de l'ACM étaient de 20 à 30 % par rapport aux animaux témoins. Ces augmentations sont en deçà des valeurs requises pour accroître la viscosité sanguine ou contribuer à un infarctus cérébral (Grotta et al., 1982; Kiyohara et al., 1985; Wiessner et al., 2001).

Dans le modèle animal d'AVC, la production accrue d'EPO expliquerait donc l'augmentation subséquente de l'hématocrite et du nombre d'érythrocytes observée chez les animaux ischémiques deux et sept jours après la reperfusion. Cette hausse des paramètres hématologiques pourrait être interprétée comme une mesure compensatoire permettant d'accroître l'apport d'oxygène au cerveau et aux autres organes. Ces effets de l'EPO systémique s'ajouteraient à ceux de l'EPO cérébrale qui inhibe l'apoptose des neurones (Chong et al., 2002) et l'infiltration des cellules inflammatoires (Villa et al., 2003) pour préconditionner le cerveau contre les épisodes subséquents d'ischémie.

L'hypotension systémique est une caractéristique du modèle d'ischémie qui était absente chez les animaux témoins (Gendron et al., 2002; Zhu et Auer, 1995). Par conséquent, les différences de tension artérielle pourraient influencer l'apport tissulaire en oxygène et expliquer l'érythropoïèse augmentée chez le groupe d'animaux soumis à l'occlusion, indépendamment de tout effet de l'ischémie sur le cerveau. Pour évaluer cette possibilité, nous avons comparé deux groupes d'animaux témoins, l'un dont la tension artérielle moyenne était contrôlée et maintenue à 60 mmHg (groupe de rats hypotendus), et l'autre dont la tension artérielle était normale (groupe de rats normotendus). Les deux groupes ont reçu une ventilation et une oxygénation adéquates durant l'intervention (60 minutes). Nous n'avons observé aucune différence dans les paramètres hématologiques, incluant les variables érythrocytaires entre les deux groupes. Des études dans d'autres modèles humains et animaux ont montré que la PaO₂ n'était pas affectée par l'hypotension tant que la ventilation était assurée par une oxygénothérapie, comme nous l'avons fait (Fukusaki et al., 2000; van de Bor et al., 1999). Étant donné que dans notre modèle

d'occlusion de l'ACM, les animaux recevaient une ventilation et une oxygénation adéquates durant l'ischémie et que les paramètres hématologiques du groupe témoin de rats hypotendus ne différaient pas de ceux du groupe témoin de rats normotendus, il est peu probable que l'hypotension soit responsable des changements notés dans les gaz sanguins et dans les paramètres hématologiques.

11.4. Expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires dans l'hémisphère cérébral ischémique, le sang et la rate

Dans nos expériences, nous avons observé que l'expression des ARNm de l'IL-1 β , de l'IL-6 et du TNF- α était induite dans le cerveau ischémique 6 heures après reperfusion et que la réponse était maximale après 18 à 24 heures selon l'ordre croissant suivant : TNF- α < IL-1 β \leq IL-6 (Gendron et al., 2004a). L'ARNm d'aucune cytokine n'a été décelée dans le cerveau non ischémique au cours de cette période, ce qui a également été le cas dans d'autres études (Berti *et al.*, 2002). Les résultats de Berti et ses collaborateurs (2002) indiquent qu'il n'y avait aucune différence entre les deux hémisphères en ce qui a trait aux ARNm du TNF- α 72 heures après la lésion. De plus, dans l'expérience de Berti et ses collaborateurs (2002), les concentrations d'ARNm de l'IL-1 β et de l'IL-6 ont atteint leur maximum entre 6 et 24 heures. Bien que l'ARNm du TNF- α soit peu exprimé dans le tissu cérébral normal, une expression accrue a été démontrée en présence d'une ischémie cérébrale focale suite à l'occlusion permanente de l'ACM (Liu *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994). Hill et ses collaborateurs (1999) ont obtenu les mêmes résultats que nous, mais chez la souris, où les concentrations maximales d'ARNm du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 ont été observées 18 heures après l'ischémie.

D'autres études ont montré que les concentrations d'ARNm de l'IL-1 β augmentaient dans le cortex ischémique dès les premières heures suivant l'occlusion permanente de l'ACM et pendant une période allant jusqu'à 4 jours par la suite, chez des rats normotendus et spontanément hypertendus (Arvin et al., 1996; Buttini et al., 1994; Liu et al., 1993). Les niveaux d'ARNm de l'IL-1 β des rats spontanément hypertendus dépassaient ceux des rats normotendus. Dans un modèle d'ischémie focale transitoire, les niveaux d'ARNm d'IL-1 β ont augmenté en quelques minutes et ont atteint un maximum dans les heures qui ont suivi la reperfusion (Hara et al., 1997; Zhang et al., 1998).

L'hypothèse selon laquelle l'IL-6 jouerait un rôle dans la réponse du cerveau à une lésion ischémique focale est appuyée par l'induction de son ARNm (Wang et al., 1995) et par l'accroissement considérable de son activité biologique dans l'hémisphère ischémique (Loddick et al., 1998) après une occlusion de l'ACM chez le rat. L'injection d'IL-6 recombinante dans les ventricules cérébraux réduit significativement la lésion ischémique provoquée par l'occlusion de l'ACM chez le rat, ce qui suggère que cette cytokine est un important inhibiteur endogène de la mort neuronale durant l'ischémie cérébrale (Loddick et al., 1998). Des augmentations de concentration plasmatique d'IL-6 ont été observées chez les patients présentant un AVC en association avec une plus grande lésion tissulaire (Tarkowski et al., 1995a). À l'inverse, l'IL-6 pourrait avoir des propriétés anti-inflammatoire ou neuroprotective comme indiqué précédemment (Loddick et al., 1998; Tilg et al., 1994).

En plus d'étudier les niveaux des cytokines dans le SNC, nous avons examiné l'expression de leur ARNm en périphérie. Notre étude révèle une stimulation de l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α dans le sang et la rate. La réponse est retardée de 24 heures environ comparativement à l'expression des ARNm des cytokines dans le cerveau, et elle est transitoire, atteignant son maximum après 2 jours et revenant à la normale après 7 jours. L'effet de l'AVC sur les concentrations plasmatiques de l'IL-1 β chez des patients a été peu documenté. Les concentrations sériques d'IL-1 β ne paraissent pas être contrôlées par l'AVC bien que la production intrathécale d'IL-1 β soit possible (Fassbender *et al.*, 1994; Tarkowski *et al.*, 1995a). Une corrélation a été observée entre l'expression accrue de l'ARNm de l'IL-1 β dans des cellules mononucléées périphériques et le degré de déficit neurologique (Kostulas *et al.*, 1999). Dans une étude auprès de patients ayant présenté une ischémie cérébrale aiguë, les concentrations circulantes d'IL-6 avaient augmenté significativement, atteignant un plateau après une période de 10 heures à 3 jours, avant de revenir aux valeurs initiales après 7 jours (Fassbender *et al.*, 1994). L'hypoxie systémique post-AVC que nous avons observée pourrait intervenir dans la stimulation de l'expression des cytokines inflammatoires en périphérie, à l'instar de ce que l'on constate pour les taux plasmatiques d'EPO, une cytokine anti-inflammatoire. Des augmentations des concentrations des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α dans le sang et la rate ont été observées

aussi dans d'autres modèles animaux avec hypoxémie (Benyo et al., 1997; Ertel et al., 1995; Knöferl et al., 2000; Takabatake et al., 2000).

La réponse inflammatoire systémique à l'ischémie cérébrale entraîne la production des ARNm des cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF- α dans le sang et dans la rate, les mêmes ARNm des cytokines qui sont induites dans l'hémisphère ischémique, comme le montrent nos travaux (Gendron et al., 2004a). Ces cytokines contribuent à la symptomatologie de la maladie, à la fièvre et à plusieurs symptômes non spécifiques de l'inflammation, mais leur rôle délétère ou bénéfique dans les lésions ischémiques n'est pas encore très clair. Les travaux réalisés dans d'autres modèles d'inflammation du cerveau indiquent que les cytokines qui circulent dans le sang peuvent interagir avec les neurones du cerveau par plusieurs voies différentes (Konsman *et al.*, 2002, Perry, 2004). La première voie fait intervenir les organes circumventriculaires, des régions du cerveau dépourvues d'une barrière hémato-encéphalique intacte. Dans ces organes, les cytokines diffusent librement du sang vers le parenchyme cérébral où elles peuvent interagir avec les macrophages. La deuxième voie par laquelle les cytokines interagissent avec le cerveau passe par la barrière hémato-encéphalique intacte. Les cytokines activent l'endothélium, lequel envoie des signaux aux macrophages périvasculaires situés juste à côté des cellules endothéliales; ces macrophages à leur tour communiquent avec les macrophages résidant à l'intérieur du parenchyme cérébral, les cellules de la microglie. Une troisième voie passe par des afférences sensorielles du nerf vague qui communiquent avec des populations de neurones à l'intérieur du tronc cérébral après une inflammation dans la cavité péritonéale. Enfin, une quatrième voie fait intervenir le transport actif de cytokines à travers la barrière hémato-encéphalique, ce qui aurait un impact sur les processus cognitifs (Banks *et al.*, 2003).

11.5. Effets de l'occlusion temporaire de l'ACM sur les globules blancs dans le sang et la rate

Nous avons observé des différences significatives entre les animaux ischémiques et les témoins quant au nombre de leucocytes du sang 24 heures après la reperfusion et par la suite jusqu'au 14^e jour inclusivement (Gendron et al., 2004b). La diminution importante de leucocytes sanguins observée chez les animaux ischémiques est due principalement à une baisse du nombre de lymphocytes, alors que le nombre de PMN est demeuré inchangé (données non montrées).

La leucopénie post-ischémique chez le rat est opposée à la leucocytose décrite dans les études antérieures (Audebert et al., 2004; Kazmierski et al., 2004; Smith et al, 2004). Fait intéressant, ces études antérieures ont été réalisées principalement chez des patients victimes d'AVC, et à notre connaissance, aucune étude n'a examiné en détail l'évolution du nombre de globules blancs sanguins dans des modèles d'occlusion temporaire de l'ACM chez le rat. Plusieurs raisons peuvent expliquer les effets opposés de l'ischémie cérébrale sur les globules blancs sanguins chez le rat et l'humain. En effet, le rat et l'homme ont des formules sanguines inversées, puisque les lymphocytes représentent la majorité (70-80%) des leucocytes sanguins chez le rat, alors que chez l'homme, ce sont les PMN qui sont majoritaires. De plus, les leucocytoses observées chez les patients sont parfois mesurées à l'admission, dans les 12 premières heures après AVC (Kazmierski et al., 2004), ce qui laisse penser que ces leucocytoses pré-existaient entre l'apparition de l'AVC et le moment de la prise de sang à l'hôpital. Le nombre élevé de globules blancs dans le sang des patients présentant un AVC est associé à un mauvais pronostic (Audebert et al., 2004; Kazmierski et al., 2004; Smith et al, 2004) et il est difficile de les dissocier d'une maladie infectieuse pré-existante, ou d'autres maladies inflammatoires telles que l'athérosclérose, qui sont considérées comme des facteurs de risque importants de l'AVC (Audebert et al., 2004; Emsley et al., 2003).

Les victimes d'AVC qui ont participé à l'étude d'Audebert et ses collaborateurs (2004) et qui ont montré une amélioration des fonctions neurologiques après un traitement thrombolytique présentaient une diminution du nombre de leucocytes sanguins. À l'inverse, les sujets dont l'état ne s'était pas amélioré après la thrombolyse présentaient une hausse du nombre de leucocytes sanguins (Audebert et al., 2004). Ces résultats suggèrent que la diminution du nombre de leucocytes sanguins est associée à un meilleur pronostic et au succès d'une reperfusion cérébrale adéquate. Cette hypothèse pourra être testée dans le modèle d'occlusion de l'ACM en comparant les effets de l'occlusion temporaire à ceux de l'occlusion permanente sur le nombre de leucocytes sanguins.

L'ischémie cérébrale est accompagnée d'une réduction du nombre total des globules blancs spléniques entre 2 et 28 jours après la reperfusion (Gendron et al., 2002). Cette baisse est maximale au 14^e jour, après quoi le nombre de cellules augmente progressivement, mais demeure tout de même significativement plus faible que les valeurs des témoins. Il n'y avait aucune différence dans les pourcentages de lymphocytes T spléniques CD5⁺-CD4⁺, de cellules exprimant le CMH de classe II et de macrophages

ED1+ entre les animaux ayant subi une ischémie cérébrale et les animaux témoins. Toutefois, le pourcentage de lymphocytes T cytotoxiques CD5+-CD8+ a baissé de manière passagère 48 heures après l'ischémie cérébrale pour revenir ensuite au niveau des animaux témoins sept jours après l'ischémie.

La cinétique des changements du nombre de leucocytes spléniques (Gendron et al., 2002) et ceux des leucocytes sanguins décrits plus haut (Gendron et al., 2004b) concorde bien avec celle d'études antérieures montrant un afflux de macrophages, de lymphocytes T CD5+, principalement des lymphocytes T CD5+-CD8+, et de cellules tueuses naturelles dans le cerveau de rat présentant des lésions ischémiques produites par photothrombose ou une occlusion permanente de l'ACM (Schroeter et al., 1994). Dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire produite par l'occlusion intraluminale de l'ACM droite pendant une heure, ce qui ressemble à notre modèle, on a observé un envahissement et une accumulation de PMN dans les zones ischémiques après 1 à 3 jours, mouvement suivi d'une infiltration massive de macrophages après trois à quatorze jours (Kato et al., 1996; Yamagami et al., 1999). Par conséquent, il semble que les leucocytes des tissus immuns périphériques, y compris le sang périphérique et la rate, contribuent à la réponse immunitaire déclenchée par une ischémie dans le SNC en quittant la périphérie et en pénétrant rapidement dans le SNC. Une autre possibilité est l'accroissement de la mort cellulaire des lymphocytes activés à la suite de la réponse inflammatoire systémique. Cette hypothèse est confirmée par une étude récente montrant que l'ischémie cérébrale induit la mort massive des lymphocytes par apoptose dans la rate et le thymus chez la souris (Prass et al., 2003a). Cette dernière étude confirme aussi la lymphopénie marquée dans les organes lymphoïdes (sang, rate et thymus) après occlusion transitoire de l'ACM chez la souris.

Nos résultats révèlent que la prolifération des lymphocytes B et T spléniques en réponse à divers agents mitogènes *in vitro* est augmentée chez les animaux atteints d'ischémie cérébrale comparativement aux témoins (Gendron et al., 2002). Cette prolifération lymphocytaire accrue apparaît très tôt après la levée de l'occlusion de l'ACM et persiste pendant toute la période d'observation de 28 jours après l'ischémie. Une stimulation générale semblable des réponses immunitaires cellulaire et humorale a été observée dans d'autres types de lésion ischémique, y compris l'ischémie myocardique (Murray et al., 1996), ce qui laisse penser qu'il pourrait s'agir d'une réaction systémique courante de l'organisme à une inflammation tissulaire locale. Ces résultats indiquent aussi

qu'en dépit de la diminution de leur nombre, les lymphocytes résiduels en périphérie se trouvent dans un état activé après ischémie cérébrale aiguë.

11.6. Absence d'asymétrie fonctionnelle des effets de l'AVC sur le système immunitaire

L'hypothèse selon laquelle il y aurait un lien entre le système immunitaire et le SNC suscite énormément d'intérêt depuis une vingtaine d'années (Benveniste, 1998; Kohm et Sanders, 2001; Webster et al., 2002). Des études antérieures utilisant des modèles d'ablation du néocortex ont montré que le cerveau intervenait dans la modulation du système immunitaire (Barneoud et al., 1990; La Hoste et al., 1989; Neveu et al., 1989b; Renoux et al., 1983a). Ces études ont révélé que des lésions du néocortex gauche dépriment l'immunité cellulaire en périphérie, tandis que des lésions du côté droit stimulent cette immunité, ce qui suggère une latéralisation de la régulation cérébrale des réactions immunitaires. Ces différences ne sont pas liées à l'espèce animale, étant donné que les travaux ont été effectués tant chez la souris (Neveu et al., 1991; Renoux et al., 1983b) que chez le rat (Barneoud et al., 1990; La Hoste et al., 1989), avec des résultats comparables entre les deux espèces. De plus, certains travaux réalisés chez des patients victimes d'AVC montrent que les altérations de la réponse immunitaire en périphérie sont sujettes à une latéralisation (Kawaharada et Urasawa., 1992; Saint-Marseille et al., 1996; Tarkowski et al., 1991; Tarkowski et al., 1995b). D'autres travaux suggèrent que c'est la région atteinte plutôt que l'hémisphère qui module la réaction immunitaire (Vlajkovic et al., 1993). De plus, les lésions électrolytiques de l'hypothalamus ont un effet immunosuppresseur tandis que celles de l'hippocampe et de l'amygdale entraînent une immunostimulation (Cross et al., 1980; Cross et al., 1984; Roszman et al., 1985a; Roszman et al., 1985b; Roszman et Brooks, 1985). Dans notre étude, nous avons utilisé une version modifiée du modèle d'infarctus par occlusion transitoire de l'ACM produisant à la fois des lésions corticales et sous-corticales (Gillardon et al., 1996; Peng et al., 1996; Zhu et Auer, 1995), pour étudier davantage les effets de lésions ischémiques unilatérales du cerveau sur les variables érythrocytaires, le nombre et la proportion des différents types de cellules immunitaires chez le rat, ainsi que la réponse mitogénique *in vitro* des lymphocytes isolés de la rate des animaux ischémiques. Ce modèle offre l'avantage d'être plus proche des conditions physiopathologiques normales que les modèles d'ablation du néocortex ou ceux de lésions électrolytiques des zones sous-corticales. L'ablation du néocortex comporte des problèmes méthodologiques particulièrement importants. En effet, après une atteinte du cortex, il se

produit de nombreuses modifications fonctionnelles secondaires. Celles-ci peuvent masquer le rôle respectif de chaque hémisphère dans la neuro-immunomodulation (Barneoud et al., 1991). En outre, l'ablation du cortex nécessite une intervention chirurgicale invasive et produit des changements de la réponse physiologique, notamment la pression intracrânienne, la tension artérielle, etc. Par conséquent, l'interprétation des études d'ablation est compliquée par les diverses conséquences inhérentes à ce type de manipulation telles que le dérèglement des mécanismes de rétrocontrôle.

Les résultats de notre étude révèlent une augmentation de toutes les variables érythrocytaires incluant le nombre des globules rouges, l'hématocrite et la concentration d'hémoglobine quelque soit l'hémisphère lésé (Gendron et al., 2004b). De plus, le nombre de globules blancs sanguins (Gendron et al., 2004b) et celui des globules blancs spléniques (Gendron et al., 2002) sont diminués chez les animaux avec ischémie cérébrale par rapport aux témoins, indépendamment de l'hémisphère lésé. Il en est de même pour la réponse proliférative des lymphocytes spléniques stimulés *in vitro* par des mitogènes T ou B, réponse qui est augmentée après ischémie cérébrale gauche ou droite (Gendron et al., 2002). Ces résultats indiquent clairement que les effets de l'ischémie cérébrale aiguë sur les paramètres hématologiques et immunologiques en périphérie ne dépendent pas de l'hémisphère lésé chez le rat Wistar.

L'absence d'asymétrie hémisphérique des altérations hématologiques et immunologiques induites par l'occlusion transitoire de l'ACM chez le rat Wistar est probablement en rapport avec les régions du cerveau qui sont atteintes. En effet, chaque hémisphère semble être hétérogène dans ses fonctions d'immunorégulation. Les effets des lésions unilatérales limitées aux régions pariéto-occipitales sont différents de ceux des lésions touchant tout le cortex fronto-pariéto-occipital (Barneoud et al., 1987). Après des lésions étendues de l'hémisphère gauche, les fonctions des lymphocytes B et T et des macrophages déclinent tandis qu'après des lésions étendues de l'hémisphère droit, elles augmentent ou demeurent inchangées. En présence de lésions peu étendues de l'hémisphère droit, on n'observe des diminutions que pour certains de ces paramètres et il n'y a aucun changement après des lésions peu étendues de l'hémisphère gauche. Le fait que différents paramètres immunologiques ne semblent pas être atteints de la même façon par différentes lésions suggère que chaque hémisphère contient à la fois des zones stimulatrices et des zones suppressives pouvant interagir à l'intérieur d'un même hémisphère ou entre les deux hémisphères. Par exemple, des lésions destructrices de l'hypothalamus antérieur

provoquent une diminution du nombre de cellules de la rate et du thymus et une baisse de la prolifération des lymphocytes spléniques en réponse à des agents mitogènes, tandis que des lésions de l'hippocampe ou de l'amygdale entraînent une augmentation de la réaction mitogénique des lymphocytes spléniques (Brooks et al., 1982; Roszman et al., 1985a). Les observations de ces études conjuguées à celles de notre travail indiquent que des lésions mécaniques ou ischémiques des structures sous-corticales telles que l'hypothalamus antérieur, l'hippocampe et l'amygdale modulent la réponse immunitaire à une atteinte du néocortex et entraînent une activation immunitaire en périphérie. Autre fait intéressant, dans les études de Tarkowski et ses collaborateurs (Tarkowski et al., 1991; Tarkowski et al., 1995b), une augmentation systémique de la réaction d'hypersensibilité cutanée retardée a été observée dans la phase chronique de la maladie chez des victimes d'AVC chez lesquels des lésions sous-corticales étaient la cause des déficits moteurs, une autre indication que les lésions sous-corticales peuvent moduler l'influence du néocortex sur la réponse immunitaire.

11.7. Absence d'asymétrie fonctionnelle des effets de l'AVC sur le système nerveux autonome

L'absence d'asymétrie des effets de l'AVC sur le système immunitaire est corrélée avec une absence d'asymétrie sur le système nerveux autonome qui assure le relais de l'information du cerveau vers le système immunitaire (Gendron et al., 2002). En fait, l'examen de la modification de la tension artérielle en réponse à l'occlusion et des concentrations plasmatiques de noradrénaline mesurées aux mêmes moments que les paramètres immunologiques ne révèle aucune différence évidente dans la réponse du système autonome selon que l'ischémie est du côté droit ou du côté gauche. Les études expérimentales et cliniques antérieures rapportant une latéralisation de la régulation immunitaire n'ont pas mesuré les effets sur le système autonome (Barneoud et al., 1990; La Hoste et al., 1989; Meador et al., 1999; Neveu et al., 1991; Saint-Marseille et al., 1996; Tarkowski et al., 1991). Toutefois, des études détaillées sur les conséquences d'un AVC expérimental sur le système autonome ont mis en évidence une hausse des concentrations plasmatiques de noradrénaline seulement chez les rats ayant subi une occlusion de l'ACM droite (Hachinski et al., 1992). Dans cette dernière étude, une occlusion permanente de l'ACM a été utilisée comme modèle (comparativement à une occlusion transitoire de l'ACM suivie de reperfusion dans notre cas); de plus, l'étude cinétique des changements

des concentrations plasmatiques de noradrénaline était limitée aux 4 premières heures de l'occlusion permanente (Hachinski et al., 1992). Fait plus important, la tension artérielle a été réduite et maintenue à 60 mm Hg dans notre modèle, alors qu'elle n'était pas maîtrisée dans l'étude de Hachinski et al. (1992), ce qui a probablement entraîné des variations spontanées importantes de tensions artérielles chez chaque animal pris individuellement en fonction du temps, et d'un animal à un autre.

Des données contradictoires ont été rapportées quant aux effets différentiels des hémisphères cérébraux gauche et droit sur d'autres fonctions du système nerveux autonome telles que la régulation de la fréquence cardiaque en réponse à l'AVC aigu (Algra et al., 2003; Colivicchi et al., 2004; Klingelhofer et Sander, 1997; Korpelainen et al., 1999; Robinson et al., 1997). À la lumière de ces contradictions, et des résultats de notre étude, il semble évident que des asymétries cérébrales ne sont pas présentes dans toutes les situations et que de nombreux facteurs tels que l'emplacement des lésions ischémiques dans chaque hémisphère, ainsi que les délais de temps écoulés depuis la survenue de l'événement ischémique peuvent avoir un effet crucial sur la latéralisation des réponses immunitaires et celles du système nerveux autonome.

Il est intéressant de noter que la hausse de la concentration plasmatique de noradrénaline observée chez les animaux ischémiques (Gendron et al., 2002) pourrait être due à l'hypoxémie. Celle-ci provoque, soit directement, soit par ses effets métaboliques, une vasodilatation de la plupart des lits vasculaires, de sorte que le tonus sympathique augmente par un phénomène réflexe pour éviter une vasodilatation exagérée et une hypotension (Laughlin et al., 1996; Rowell et al., 1989). Une activité sympathique accrue a également été rapportée chez les patients souffrant d'hypoxémie chronique (Heindl et al., 2001) ainsi que chez les patients atteints d'apnée du sommeil qui présentent une hypoxémie intermittente (Imadojemu et al., 2002). Les travaux de Prass et ses collaborateurs (2003a) suggèrent que l'activation du système sympathique est à l'origine des altérations immunologiques observées dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris. Ces altérations immunologiques ainsi que les complications infectieuses et la mortalité secondaires à l'ischémie cérébrale sont diminuées par le traitement des animaux avec des bêta-bloqueurs (Prass et al., 2003a).

11.8. Limites de cette étude

Le modèle d'AVC utilisé dans notre étude présente certaines faiblesses. Ainsi, bien que la taille générale de l'infarctus soit plutôt constante, la répartition des diverses structures atteintes ne l'est pas nécessairement. L'examen macroscopique que nous avons réalisé indique que l'hypothalamus n'a été atteint que rarement par l'ischémie. L'amygdale était ischémique chez la plupart des animaux, mais pas tous, et des lésions distantes ont été observées dans l'hippocampe. Cependant, une analyse complète des structures ayant pu être atteintes pourrait fournir des renseignements plus précis, d'autant plus que les lésions de l'hypothalamus et de l'amygdale peuvent produire des effets diamétralement opposés sur l'immunité.

La hausse des paramètres érythrocytaires après occlusion de l'ACM est probablement causée par une augmentation compensatoire de l'EPO en réponse à l'hypoxie systémique. Cependant, des études ultérieures mesurant le nombre de réticulocytes ou le volume total de globules rouges fourniront des données additionnelles pour appuyer cette interprétation.

Il serait également intéressant de préciser le sort des cellules spléniques après l'occlusion transitoire de l'ACM. En effet, la baisse des lymphocytes spléniques n'est probablement pas due uniquement à une migration vers le cerveau, mais une redistribution dans d'autres tissus lymphoïdes et non lymphoïdes ainsi que l'apoptose pourraient y avoir contribué. Des mouvements en périphérie sont très probables, à la lumière d'observations récentes dans d'autres modèles concernant le sort des lymphocytes T spécifiques d'antigènes dans la réponse immunitaire à l'infection (Masopust et al., 2001). Ce point mérite certainement d'être approfondi dans les modèles d'AVC.

11.9. Conclusion et perspectives futures

Ce travail a permis de démontrer que l'ischémie cérébrale aiguë entraîne une hypoxémie dans le modèle bien établi d'occlusion transitoire de l'ACM chez le rat Wistar. Ces observations ont été rendues possibles grâce aux études de cinétique à court et à long termes, et elles confirment celles des études cliniques antérieures, renforçant ainsi la validité du modèle animal. En raison de l'impact négatif possible de l'hypoxémie sur les lésions cérébrales, il devient extrêmement important de faire le suivi des gaz sanguins pendant les premières 24 h après AVC, et même au-delà de cette période, aussi bien dans

les études expérimentales sur modèles animaux, que dans les études cliniques. Un comité *ad hoc* de l'American Stroke Association avait déjà recommandé d'utiliser les méthodes d'oxymétrie pulsée pour suivre la saturation en oxygène chez les victimes d'AVC (Adams et al., 2003). Le seuil de saturation suggéré est de 95% et en cas d'hypoxémie on doit envisager l'oxygénothérapie (Adams et al., 2003). Parmi les conséquences possibles de l'hypoxie systémique figurent les modifications d'expression de certaines isoenzymes du CYP₄₅₀ impliquées dans le métabolisme de nombreux médicaments (Fradette et du Souich, 2004). En cas d'hypoxémie, le métabolisme des médicaments utilisés dans le traitement de l'AVC et biotransformés par le CYP₄₅₀ pourrait donc être affecté, ce qui pourrait se traduire par une perte d'efficacité, ou bien par des effets toxiques. Le degré d'hypoxie systémique nécessaire pour modifier le métabolisme des médicaments utilisés dans le traitement de l'AVC devra être établi. Il est donc justifié de procéder à d'autres études dans ce domaine. L'expression de certaines isoenzymes du CYP₄₅₀ est également modifiée dans l'AVC (Alkayed et al., 2002).

Ce travail démontre aussi que l'hypoxémie post-ischémie cérébrale est associée à une augmentation modeste mais significative des taux plasmatique d'EPO, du compte des globules rouges, de l'hémoglobine et de l'hématocrite. On ignore encore l'impact de ces modifications sur les lésions cérébrales, mais il est fort possible qu'elles contribuent à protéger le cerveau contre des lésions ischémiques ultérieures, en raison notamment des propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices bien connues de l'EPO, et de l'augmentation de l'apport d'oxygène au cerveau.

Parallèlement à la régulation du système de l'EPO, l'ischémie cérébrale augmente l'expression des cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF- α dans le cerveau, le sang et la rate. Le nombre des lymphocytes est diminué dans les organes lymphoïdes, mais leur état d'activation est augmenté. Tous ces effets sont compatibles avec une inflammation systémique induite par l'ischémie cérébrale, incluant une redistribution des cellules immunitaires et leur infiltration dans l'hémisphère ischémique, ainsi qu'une augmentation de la mort des lymphocytes qui toutefois doit être confirmée dans d'autres études expérimentales. Les modifications hématologiques et immunologiques observées en périphérie, de même que les réponses du système nerveux autonome, sont indépendantes de l'hémisphère affecté par les lésions ischémiques, indiquant l'absence d'une asymétrie cérébrale dans ce modèle.

L'ensemble des résultats de ce travail indique clairement que l'ischémie cérébrale a des répercussions sur l'homéostasie de l'oxygène et la réponse inflammatoire en périphérie. Des travaux futurs tels que : (1) l'évaluation de l'hypoxie à plus long terme jusqu'à 7 jours post-AVC, (2) le suivi de l'infiltration des lymphocytes et l'expression des cytokines inflammatoires dans le cerveau, (3) l'étude du devenir (apoptose) des cellules immunologiques en périphérie, (4) l'évaluation de la latéralisation dans un modèle animal d'AVC n'affectant que les structures corticales et finalement (5) l'évaluation histologique des structures corticales et sous corticales dans l'AVC ischémique permettront d'élucider les mécanismes impliqués dans ces effets, de même que leur impact positif ou négatif sur l'évolution des lésions cérébrales et la récupération des fonctions neurologiques après AVC.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbrecht PH, Littell JK.** Plasma erythropoietin in men and mice during acclimatization to different altitudes. *J Appl Physiol.* 1972;32:54-58.
- Abraham H, Lazar G.** Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res.* 2000;862:63-73.
- Abraham E.** NF-kappaB activation. *Crit Care Med.* 2000 Apr;28:N100-N104.
- Acker H.** Cellular oxygen sensors. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;718:3-10.
- Adams HP Jr, Adams RJ, Brott T, del Zoppo GJ, Furlan A, Goldstein LB, Robert L. Grubb RL, Higashida R, Kidwell C, Kwiatkowski TG, Marler JR, George J. Hademenos GJ.** Guidelines for the Early Management of Patients With Ischemic Stroke A Scientific Statement From the Stroke Council of the American Stroke Association. *Stroke.* 2003;34:1056-1083.
- Adcock IM, Ito K.** Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2000;55:256-266.
- Ader R, Felten D, Cohen N.** Interactions between the brain and the immune system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990;30:561-602.
- Ader R, Madden K, Felten DL, Bellinger DL, Schiffer RB.** Psychoneuroimmunology: interactions between the brain and the immune system. In: Fogel BS, Schiffer RB, Rao SM, eds. *Neuropsychiatry.* Baltimore: Williams & Wilkins, 1996; pp. 193-221.
- Aderka D, Le JM, Vilcek J.** IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol.* 1989;143:3517-3523.
- Adhikary G, Kline D, Yuan G, Kumar GK, Simonson MS, Cherniack NS, Prabhakar NR.** Gene regulation during intermittent hypoxia: evidence for the involvement of reactive oxygen species. *Adv Exp Med Biol.* 2001;499:297-302.
- Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, Ghezzi P.** Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* 2002;952:128-134.
- Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS.** Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke.* 1996;27:1739-17343.

- Algra A, Gates PC, Fox AJ, Hachinski V, Barnett HJ; North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Group.** Side of brain infarction and long-term risk of sudden death in patients with symptomatic carotid disease. *Stroke*. 2003;34:2871-2875.
- Alkayed NJ, Goyagi T, Joh HD, Klaus J, Harder DR, Traystman RJ, Hurn PD.** Neuroprotection and P450 2C11 upregulation after experimental transient ischemic attack. *Stroke*. 2002;33:1677-1684.
- Allan SM, Rothwell NJ.** Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2:734-744.
- Allen RG, Tresini M.** Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:463-499.
- Alvarez-Sabin J, Molina CA, Montaner J, Arenillas JF, Huertas R, Ribo M, Codina A, Quintana M.** Effects of admission hyperglycemia on stroke outcome in reperfused tissue plasminogen activator--treated patients. *Stroke*. 2003;34:1235-1241.
- Amellem O, Pettersen EO.** Cell cycle progression in human cells following re-oxygenation after extreme hypoxia: consequences concerning initiation of DNA synthesis. *Cell Prolif*. 1993;26:25-35.
- Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M.** Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:5978-5982.
- Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT.** Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:3974-3978.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P.** Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 1995;15:961-973.
- Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T.** Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem*. 1990;59:783-836.
- Aronowski J, Strong R, Grotta JC.** Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:1048-1056.
- Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein GZ.** The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996;20:445-452.

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM.** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
- Ashkenazi A, Dixit VM.** Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998;281:1305-1308.
- Asinger RW, Mikell FL, Elsperger J, Hodges M.** Incidence of left-ventricular thrombosis after acute transmural myocardial infarction. Serial evaluation by two-dimensional echocardiography. *N Engl J Med*. 1981;305:297-302.
- Astrup J.** Energy-requiring cell functions in the ischemic brain. Their critical supply and possible inhibition in protective therapy. *J Neurosurg*. 1982;56:482-497.
- Astrup J, Siesjo BK, Symon L.** Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981;12:723-725.
- Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA.** Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke*. 1977;8:51-57.
- Audebert HJ, Rott MM, Eck T, Haberl RL.** Systemic inflammatory response depends on initial stroke severity but is attenuated by successful thrombolysis. *Stroke*. 2004;35:2128-2133.
- Aune TM, Pogue SL.** Inhibition of tumor cell growth by interferon-gamma is mediated by two distinct mechanisms dependent upon oxygen tension: induction of tryptophan degradation and depletion of intracellular nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest*. 1989;84:863-875.
- Azzimondi G, Bassein L, Nonino F, Fiorani L, Vignatelli L, Re G, D'Alessandro R.** Fever in acute stroke worsens prognosis. A prospective study. *Stroke*. 1995;26:2040-2043.
- Babior BM.** Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 2000;109:33-44.
- Bach KB, Mitchell GS.** Hypoxia-induced long-term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent. *Respir Physiol*. 1996;104:251-260.
- Back T, Kohno K, Hossmann KA.** Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994; 14:12-19.

- Backhauss C, Karkoutly C, Welsch M, Krieglstein J.** A mouse model of focal cerebral ischemia for screening neuroprotective drug effects. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1992;27:27-32
- Bacon PJ, Love SA, Gupta AK, Kirkpatrick PJ, Menon DK.** Plasma antioxidant consumption associated with ischemia/reperfusion during carotid endarterectomy. *Stroke.* 1996;27:1808-1811.
- Badr AE, Yin W, Mychaskiw G, Zhang JH.** Dual effect of HBO on cerebral infarction in MCAO rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 280:R766-R770.
- Baeuerle PA, Henkel T.** Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:141-179.
- Baixeras E, Bosca L, Stauber C, Gonzalez A, Carrera AC, Gonzalo JA, Martinez C.** From apoptosis to autoimmunity: insights from the signaling pathways leading to proliferation or to programmed cell death. *Immunol Rev.* 1994;142:53-91.
- Baker RN.** Anticoagulant therapy in cerebral infarction. Report on cooperative study. *Neurology.* 1962;12:823-835.
- Balasingam V, Yong VW.** Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *J Neurosci.* 1996;16:2945-2955.
- Baldwin AS Jr.** The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-683.
- Baldwin HA, Snape MF, Williams JL, Misra A, Jones JA, Snares M, Green AR, Cross AJ.** The role of glutamate and GABA in a rat model of focal cerebral ischemia: biochemical and pharmacological investigations. *Neurodegeneration.* 1993;2:129-138
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW.** Cytotoxicity of microglia. *Glia.* 1993;7:111-118.
- Banati RB, Graeber MB.** Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia? *Dev Neurosci.* 1994;16:114-127.
- Banks WA, Farr SA, Morley JE.** Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation.* 2003;10:319-327.
- Banks WA, Ortiz L, Plotkin SR, Kastin AJ.** Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;259:988-996.

- Barber PA, Davis SM, Darby DG, Desmond PM, Gerraty RP, Yang Q, Jolley D, Donnan GA, Tress BM.** Absent middle cerebral artery flow predicts the presence and evolution of the ischemic penumbra. *Neurology*. 1999;52:1125-1132.
- Bardos P, Degenne D, Lebranchu Y, Biziere K, Renoux G.** Neocortical lateralization of NK activity in mice. *Scand J Immunol*. 1981;13:609-611.
- Barneoud P, le Moal M, Neveu PJ.** Asymmetric distribution of brain monoamines in left- and right-handed mice. *Brain Res*. 1990;520:317-321.
- Barneoud P, Neveu PJ, Vitiello S, Le Moal M.** Functional heterogeneity of the right and left cerebral neocortex in the modulation of the immune system. *Physiol Behav*. 1987;41:525-530.
- Barneoud P, Neveu PJ, Vitiello S, Mormede P, Le Moal M.** Brain neocortex immunomodulation in rats. *Brain Res*. 1988;474:394-398.
- Barneoud P, Rivet JM, Vitiello S, Le Moal M, Neveu PJ, Barneoud P.** Brain norepinephrine levels after BCG stimulation of the immune system. *Immunol Lett*. 1988;18:201-204.
- Barnes PJ, Adcock IM.** Transcription factors and asthma. *Eur Respir J*. 1998;12:221-234.
- Barnett HJ, Boughner DR, Taylor DW, Cooper PE, Kostuk WJ, Nichol PM.** Further evidence relating mitral-valve prolapse to cerebral ischemic events. *N Engl J Med*. 1980;302:139-144.
- Baron JC, von-Kummer R, del-Zoppo GJ.** Treatment of acute stroke. Challenging the concept of a rigid and universal time window. *Stroke*. 1995;26:2219-2221.
- Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ.** Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke*. 1997;28:1233-1244.
- Barone FC, Feuerstein GZ.** Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:819-834
- Barone FC, Schmidt DB, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Feuerstein GZ, Clark RK, Lee EV, Griswold DE, Sarau HM.** Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. *Stroke*. 1992;23:1337-1347
- Barth A, Barth L, Morrison RS, Newell DW.** bFGF enhances the protective effects of MK-801 against ischemic neuronal injury in vitro. *Neuroreport*. 1996;7:1461-1464.

- Barth A, Barth L, Newell DW.** Combination therapy with MK-801 and alpha-phenyl-tert-butyl-nitron enhances protection against ischemic neuronal damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol.* 1996;141:330-336.
- Barton BE, Jackson JV.** Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. *Infect Immun.* 1993;61:1496-1499.
- Bassetti C, Aldrich MS.** Sleep apnea in acute cerebrovascular diseases: final report on 128 patients. *Sleep.* 1999;22:217-223.
- Bateman NT, Leach RM.** ABC of oxygen. Acute oxygen therapy. *BMJ.* 1998;317:798-801.
- Beal MF.** Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol.* 1992;31:119-130.
- Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W.** Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci.* 1993;16:125-131.
- Beamer NB, Coull BM, Clark WM, Hazel JS, Silberger JR.** Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. *Ann Neurol.* 1995;37:800-805.
- Beck T, Lindholm D, Castren E, Wree A.** Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:689-692.
- Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD.** Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke.* 1996;27:1616-1622.
- Bellon RJ, Putman CM, Budzik RF, Pergolizzi RS, Reinking GF, Norbash AM.** Rheolytic thrombectomy of the occluded internal carotid artery in the setting of acute ischemic stroke. *Am J Neuroradiol.* 2001;22:526-530.
- Beltkamp R, Warner DS, Domoki F, Brinkhous AD, Toole JF, Busija DW.** Hyperbaric oxygen decreases infarct size and behavioral deficit after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2000;853:68-73.
- Benveniste EN.** Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9:259-275.
- Benyo DF, Miles TM, Conrad KP.** Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:1582-1588.

- Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, Schwab SJ, Goodkin DA.** The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Engl J Med.* 1998;339:584-590.
- Beray-Berthat V, Croci N, Plotkine M, Margail I.** Polymorphonuclear neutrophils contribute to infarction and oxidative stress in the cortex but not in the striatum after ischemia-reperfusion in rats. *Brain Res.* 2003;987:32-38.
- Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR.** Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci.* 1999;11:4159-4170.
- Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, Semenza GL, Ferriero DM, Sharp FR.** Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol.* 2000;48:285-296.
- Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F, Besedovsky H.** Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science.* 1987;238:524-526.
- Bernardi P.** The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1275:5-9.
- Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, Mackenzie ET, Petit E.** Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia.* 2000;30:271-278.
- Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E.** A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:643-651.
- Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzie ET, Petit E, Schumann-Bard P.** 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. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:393-403.
- Bernstein RA, hemphill JC.** Critical care of acute ischemic stroke. *Current Neurology and Neuroscience Reports.* 2001;1:587-592.

- Berti R, Williams AJ, Moffett JR, Hale SL, Velarde LC, Elliott PJ, Yao C, Dave JR, Tortella FC.** Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:1068-1079.
- Beru N, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E.** Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol.* 1986 ;6:2571-2575.
- Besedovsky H, del Rey A.** Mechanism of virus-induced stimulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *J Steroid Biochem.* 1989;34:235-239.
- Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Da Prada M, Burri R, Honegger C.** The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Science.* 1983;221:564-566.
- Besedovsky H, Sorkin E, Felix D, Haas H.** Hypothalamic changes during the immune response. *Eur J Immunol.* 1977;7:323-325.
- Besedovsky H, Sorkin E, Keller M, Muller J.** Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1975;150:466-470.
- Betancur C, Neveu PJ, Vitiello S, Le Moal M.** Natural killer cell activity is associated with brain asymmetry in male mice. *Brain Behav Immun.* 1991;5:162-169.
- Betz AL, Yang GY, Davidson BL.** Attenuation of stroke size in rats using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15:547-551.
- Bhanushali AA, Raghunathan R, Kalraiya RD, Mehta NG.** Cancer-related anemia in a rat model: alpha2-macroglobulin from Yoshida sarcoma shortens erythrocyte survival. *Eur J Haematol.* 2002;68:42-48.
- Biljanovic-Paunovic L, Clemons GK, Ivanovic Z, Pavlovic-Kentera V.** Erythropoietin & erythroid progenitors in rats exposed to chronic hypoxia. *Indian J Med Res.* 1996;104:304-310.
- Biziere K, Guillaumain JM, Degenne D, Bardos P, Renoux M, Renoux G.** In: Lateralized neocortical modulation of the T-cell lineage. Guillemin R et al., Eds. *Neural modulation of immunity.* New York: Raven Press. 1985; pp:81-94.
- Biziere K, Renoux G.** Interactions between the neocortex and lymphocytes. *Clin Neuropharmacol.* 1986;9:362-364.
- Blalock JE.** The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today.* 1994;15:504-511.

- Blass JP, Gibson GE.** Consequences of mild, graded hypoxia. *Adv Neurol.* 1979; 26:229-250.
- Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F.** The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke.* 1988;19:1083-1092.
- Boveris A, Oshino N, Chance B.** The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1972;128:617-630.
- Bowie A, O'Neill LA.** Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:13-23.
- Bowman ZS, Oatis JE Jr, Whelan JL, Jollow DJ, McMillan DC.** Primaquine-induced hemolytic anemia: susceptibility of normal versus glutathione-depleted rat erythrocytes to 5-hydroxyprimaquine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:79-85.
- Boysen G, Christensen H.** Stroke severity determines body temperature in acute stroke. *Stroke.* 2001;32:413-417.
- Brailowsky S, Knight RT, Blood K, Scabini D.** Gamma-Aminobutyric acid-induced potentiation of cortical hemiplegia. *Brain Res.* 1986;362:322-330.
- Branston NM, Symon L, Crockard HA, Pasztor E.** Relationship between the cortical evoked potential and local cortical blood flow following acute middle cerebral artery occlusion in the baboon. *Exp Neurol.* 1974;45:195-208.
- Brenneman DE, Schultzberg M, Bartfai T, Gozes I.** Cytokine regulation of neuronal survival. *J Neurochem.* 1992;58:454-460.
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A.** Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:10526-10531.
- Briscoe DM, Cotran RS, Pober JS.** Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. Correlation with CD3+ T cell infiltration. *J Immunol.* 1992;149:2954-2960.
- Broderick J, Brott T, Kothari R, Miller R, Khoury J, Pancioli A, Gebel J, Mills D, Minneci L, Shukla R.** The Greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study: preliminary first-ever and total incidence rates of stroke among blacks. *Stroke.* 1998;29:415-421.

- Broderick J, Talbot GT, Prenger E, Leach A, Brott T.** Stroke in children within a major metropolitan area: the surprising importance of intracerebral hemorrhage. *J Child Neurol.* 1993;8:250-255.
- Brodie C.** Differential effects of Th1 and Th2 derived cytokines on NGF synthesis by mouse astrocytes. *FEBS Lett.* 1996;394:117-120.
- Brooks WH, Cross RJ, Roszman TL, Markesbery WR.** Neuroimmunomodulation: neural anatomical basis for impairment and facilitation. *Ann Neurol.* 1982;12:56-61.
- Brown AW, Brierley JB.** The earliest alterations in rat neurones and astrocytes after anoxia-ischaemia. *Acta Neuropathol.* 1973;23:9-22
- Brown AW, Levy DE, Kublik M, Harrow J, Plum F, Brierley JB.** Selective chromatolysis of neurons in the gerbil brain: a possible consequence of "epileptic" activity produced by common carotid artery occlusion. *Ann Neurol.* 1979;5:127-138.
- Brown JM, Grosso MA, Terada LS, Beehler CJ, Toth KM, Whitman GJ, Harken AH, Repine JE.** Erythrocytes decrease myocardial hydrogen peroxide levels and reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1989;256:H584-H588.
- Brown MM, Wade JP, Marshall J.** Fundamental importance of arterial oxygen content in the regulation of cerebral blood flow in man. *Brain.* 1985;108:81-93.
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtsberg FW, Mattson MP.** Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med.* 1996;2:788-794.
- Bruer U, Weih MK, Isaev NK, Meisel A, Ruscher K, Bergk A, Trendelenburg G, Wiegand F, Victorov IV, Dirnagl U.** Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett.* 1997;414:117-121.
- Bryl E, Mysliwska J, Debska-Slizien A, Rachon D, Bullo B, Lizakowski S, Mysliwski A, Rutkowski B.** The influence of recombinant human erythropoietin on tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 production by whole blood cell cultures in hemodialysis patients. *Artif Organs.* 1998;22:177-181.
- Budinger GR, Duranteau J, Chandel NS, Schumacker PT.** Hibernation during hypoxia in cardiomyocytes. Role of mitochondria as the O₂ sensor. *J Biol Chem.* 1998;273:3320-3326.

- Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Grasso G, Corica F, Frisina N.** Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection. *Clin Sci.* 2002;103:275-282.
- Bunn HF, Poyton RO.** Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev.* 1996;76:839-885.
- Burow ME, Weldon CB, Collins-Burow BM, Ramsey N, McKee A, Klippel A, McLachlan JA, Clejan S, Beckman BS.** Cross-talk between phosphatidylinositol 3-kinase and sphingomyelinase pathways as a mechanism for cell survival/death decisions. *J Biol Chem.* 2000b;275:9628-9635.
- Burow ME, Weldon CB, Melnik LI, Duong BN, Collins-Burow BM, Beckman BS, McLachlan JA.** PI3-K/AKT regulation of NF-kappaB signaling events in suppression of TNF-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000a;271:342-345.
- Buttini M, Appel K, Sauter A, Gebicke-Haerter PJ, Boddeke HW.** Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuroscience.* 1996;71:1-16.
- Buttini M, Sauter A, Boddeke HW.** Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994;23:126-134.
- Calapai G, Marciano MC, Corica F, Allegra A, Parisi A, Frisina N, Caputi AP, Buemi M.** Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol.* 2000;401:349-356.
- Calbet JA.** Oxygen tension and content in the regulation of limb blood flow. *Acta Physiol Scand.* 2000;168:465-472.
- Calbet JA.** Chronic hypoxia increases blood pressure and noradrenaline spillover in healthy humans. *J Physiol.* 2003; 551:379-386.
- Calleja C, Eeckhoutte C, Dacasto M, Larrieu G, Dupuy J, Pineau T, Galtier P.** Comparative effects of cytokines on constitutive and inducible expression of the gene encoding for the cytochrome P450 3A6 isoenzyme in cultured rabbit hepatocytes: consequences on progesterone 6beta-hydroxylation. *Biochem Pharmacol.* 1998;56:1279-1285.

- Calleja C, Eeckhoutte C, Larrieu G, Dupuy J, Pineau T, Galtier P.** Differential effects of interleukin-1 beta, interleukin-2, and interferon-gamma on the inducible expression of CYP 1A1 and CYP 1A2 in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;239:273-278.
- Calogero AE, Gallucci WT, Gold PW, Chrousos GP.** Multiple feedback regulatory loops upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion. Potential clinical implications. *J Clin Invest.* 1988;82:767-774.
- Cannella B, Cross AH, Raine CS.** Upregulation and coexpression of adhesion molecules correlate with relapsing autoimmune demyelination in the central nervous system. *J Exp Med.* 1990;172:1521-1524.
- Cantley LC, Neel BG.** New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:4240-4245.
- Cao KY, Zwillich CW, Berthon-Jones M, Sullivan CE.** Increased normoxic ventilation induced by repetitive hypoxia in conscious dogs. *J Appl Physiol.* 1992; 73:2083-2088.
- Caplan LR, Gorelick PB, Hier DB.** Race, sex and occlusive cerebrovascular disease: a review. *Stroke.* 1986;17:648-655.
- Carafoli E.** Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:395-433.
- Carlini RG, Gupta A, Liapis H, Rothstein M.** Endothelin-1 release by erythropoietin involves calcium signaling in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26:889-892.
- Carlson SL, Felten DL, Livnat S, Felten SY.** Alterations of monoamines in specific central autonomic nuclei following immunization in mice. *Brain Behav Immun.* 1987;1:52-63.
- Carlstedt F, Lind L, Lindahl B.** Proinflammatory cytokines, measured in a mixed population on arrival in the emergency department, are related to mortality and severity of disease. *J Intern Med.* 1997;242:361-365.
- Carney JM, Floyd RA.** Protection against oxidative damage to central nervous system by a-phenyl-tert-butyl nitron (PBN) and other spin-trapping agents: a novel series of non lipid free radical scavengers. *J Mol Neurosci.* 1991;3:47-57.
- Carter LP, Yamagata S, Erspamer R.** Time limits of reversible cortical ischemia. *Neurosurgery.* 1983;12:620-623.

- Casillan AJ, Gonzalez NC, Johnson JS, Wood JG.** Microvascular responses to hypoxia are mediated by PAF (Abstract). *FASEB J.* 2000;14:A143,
- Casserly I, Topol EJ.** Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol and misfolded proteins. *Lancet.* 2004;363:1139-1146.
- Castellanos M, Castillo J, Garcia MM, Leira R, Serena J, Chamorro A, Davalos A.** Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target. *Stroke.* 2002;33:982-987.
- Chamorro A, Vila N, Ascaso C, Saiz A, Montalvo J, Alonso P, Tolosa E.** Early prediction of stroke severity. Role of the erythrocyte sedimentation rate. *Stroke.* 1995;26:573-576.
- Chan KM, Lam DT, Pong K, Widmer HR, Hefti F.** Neurotrophin-4/5 treatment reduces infarct size in rats with middle cerebral artery occlusion. *Neurochem Res.* 1996;21:763-767.
- Chan PH.** Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* 1996;27:1124-1129.
- Chan PH.** Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21:2-14.
- Chan PH, Schmidley JW, Fishman RA, Longar SM.** Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology.* 1984;34:315-320.
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT.** Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:11715-11720.
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT.** Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *J Biol Chem.* 2000;275:25130-25138.
- Chandel NS, Schumacker PT.** Cells depleted of mitochondrial DNA (rho0) yield insight into physiological mechanisms. *FEBS Lett.* 1999;454:173-176.
- Chandel NS, Schumacker PT.** Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol.* 2000;88:1880-1889.
- Chang CF, Niu KC, Hoffer BJ, Wang Y, Borlongan CV.** Hyperbaric oxygen therapy for treatment of postischemic stroke in adult rats. *Exp Neurol.* 2000;166:298-306.

- Chaouat A, Weitzenblum E, Kessler R, Schott R, Charpentier C, Levi-Valensi P, Zielinski J, Delaunois L, Cornudella R, Moutinho dos Santos J.** Outcome of COPD patients with mild daytime hypoxaemia with or without sleep-related oxygen desaturation. *Eur Respir J.* 2001;17:848-855.
- Chamorro A, Vila N, Ascaso C, Saiz A, Montalvo J, Alonso P, Tolosa E.** Early prediction of stroke severity. Role of the erythrocyte sedimentation rate. *Stroke.* 1995;26:573-576.
- Chen H, Chopp M, Schultz L, Bodzin G, Garcia JH.** Sequential neuronal and astrocytic changes after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci.* 1993;118:109-116.
- Chen H, Chopp M, Zhang RL, Bodzin G, Chen Q, Rusche JR, Todd RF.** Anti-CD11b monoclonal antibody reduces ischemic cell damage after transient focal cerebral ischemia in rat. *Ann Neurol.* 1994;35:458-463.
- Chen J, Graham SH, Nakayama M, Zhu RL, Jin K, Stetler RA, Simon RP.** Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17:2-10.
- Chen J, Simon R.** Ischemic tolerance in the brain. *Neurology.* 1997;48:306-311.
- Chen L, Huang LY.** Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature.* 1992;356:521-523.
- Cheng B, Christakos S, Mattson MP.** Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron.* 1994;12:139-153.
- Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M, Sasaki R.** Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279:E1242-E1248.
- Choi DW.** Possible mechanisms limiting N-methyl-D-aspartate receptor overactivation and the therapeutic efficacy of N-methyl-D-aspartate antagonists. *Stroke.* 1990;21:III20-III22.
- Choi DW.** Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 1992;23:1261-1276.
- Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K.** Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:503-514.

- Chopp M, Zhang RL, Chen H, Li Y, Jiang N, Rusche JR.** Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1994;4:869-875.
- Clark RK, Lee EV, Fish CJ, White RF, Price WJ, Jonak ZL, Feuerstein GZ, Barone FC.** Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res Bull*. 1993;31:565-572.
- Clark RK, Lee EV, White RF, Jonak ZL, Feuerstein GZ, Barone FC.** Reperfusion following focal stroke hastens inflammation and resolution of ischemic injured tissue. *Brain Res Bull*. 1994;35:387-392.
- Clark WM, Lauten JD, Lessov N, Woodward W, Coull BM.** Time course of ICAM-1 expression and leukocyte subset infiltration in rat forebrain ischemia. *Mol Chem Neuropathol*. 1995;2:213-230.
- Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA.** Reduction of central nervous system ischemic injury by monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule. *J Neurosurg*. 1991a;75:623-627.
- Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA.** Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment. *Stroke*. 1991b;22:877-883.
- Clark WM, Zivin JA.** Antileukocyte adhesion therapy: preclinical trials and combination therapy. *Neurology*. 1997;49:S32-S38.
- Coimbra C, Drake M, Boris-Moller F, Wieloch T.** Long-lasting neuroprotective effect of postischemic hypothermia and treatment with an anti-inflammatory/antipyretic drug. Evidence for chronic encephalopathic processes following ischemia. *Stroke*. 1996;27:1578-1585.
- Coimbra C, Wieloch T.** Moderate hypothermia mitigates neuronal damage in the rat brain when initiated several hours following transient cerebral ischemia. *Acta Neuropathol*. 1994;87:325-331.
- Colbourne F, Corbett D.** Delayed and prolonged post-ischemic hypothermia is neuroprotective in the gerbil. *Brain Res*. 1994;654:265-272.
- Cole FM, Yates PO.** The occurrence and significance of intracerebral micro-aneurysms. *J Pathol Bacteriol*. 1967;93:393-411.

- Colebatch JH, Halmagyi DF.** Reflex airway reaction to fluid aspiration. *J Appl Physiol.* 1962; 17: 787-794.
- Colivicchi F, Bassi A, Santini M, Caltagirone C.** Cardiac autonomic derangement and arrhythmias in right-sided stroke with insular involvement. *Stroke.* 2004;35:2094-2098.
- Connolly ES Jr, Winfree CJ, Stern DM, Solomon RA, Pinsky DJ.** Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. *Neurosurgery.* 1996;38:523-531
- Constantinescu SN, Keren T, Socolovsky M, Nam H, Henis YI, Lodish HF.** Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:4379-4384.
- Corbett D, Hamilton M, Colbourne F.** Persistent neuroprotection with prolonged postischemic hypothermia in adult rats subjected to transient middle cerebral artery occlusion. *Exp Neurol.* 2000;163:200-206.
- Cotes PM, Dore CJ, Yin JA, Lewis SM, Messinezy M, Pearson TC, Reid C.** Determination of serum immunoreactive erythropoietin in the investigation of erythrocytosis. *N Engl J Med.* 1986;315:283-287.
- Crockard A, Iannotti F, Hunstock AT, Smith RD, Harris RJ, Symon L.** Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in the gerbil. *Stroke.* 1980;11:494-498.
- Cross RJ, Markesbery WR, Brooks WH, Roszman TL.** Hypothalamic-immune interactions. I. The acute effect of anterior hypothalamic lesions on the immune response. *Brain Res.* 1980;196:79-87.
- Cross RJ, Markesbery WR, Brooks WH, Roszman TL.** Hypothalamic-immune interactions: neuromodulation of natural killer activity by lesioning of the anterior hypothalamus. *Immunology.* 1984;51:399-405.
- Czyzyk-Krzeska MF.** Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaptation to hypoxia. *Respir Physiol.* 1997;110:99-111.
- Czyzyk-Krzeska MF, Furnari BA, Lawson EE, Millhorn DE.** Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Biol Chem.* 1994;269:760-764.
- DAHL NA, BALFOUR WM.** Prolonged anoxic survival due to anoxia pre-exposure: brain ATP, lactate and pyruvate. *Am J Physiol.* 1964;207:452-456.

- D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Esmon CT, Comp PC.** Acquired deficiencies of protein S. Protein S activity during oral anticoagulation, in liver disease, and in disseminated intravascular coagulation. *J Clin Invest.* 1988;81:1445-1454.
- D'Angio CT, Finkelstein JN.** Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. *Mol Genet Metab.* 2000;71:371-380.
- Dawson DA, Martin D, Hallenbeck JM.** Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces focal cerebral ischemic injury in the spontaneously hypertensive rat. *Neurosci Lett.* 1996;218:41-44.
- DeGraba TJ.** The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology.* 1998;51:S62-68.
- Del Maestro RF.** An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1980;492:153-168.
- del Zoppo GJ, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ.** Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol.* 2000;10:95-112.
- del Zoppo GJ, Hallenbeck JM.** Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res.* 2000;98:73-81.
- del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM.** Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke.* 1991;22:1276-1283.
- Demet G, Talip A, Nevzat U, Serhat O, Gazi O.** The evaluation of cerebral oxygenation by oximetry in patients with ischaemic stroke. *J Postgrad Med.* 2000; 46:70-74.
- Deng H, Han HS, Cheng D, Sun GH, Yenari MA.** Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. *Stroke.* 2003;34:2495-2501.
- De Troyer A, Zegers De Beyl D, Thirion M.** Function of the respiratory muscles in acute hemiplegia. *Am Rev Respir Dis.* 1981;123:631-632.
- deVeber G, Monagle P, Chan A, MacGregor D, Curtis R, Lee S, Vegh P, Adams M, Marzinotto V, Leaker M, Massicotte MP, Lillicrap D, Andrew M.** Prothrombotic disorders in infants and children with cerebral thromboembolism. *Arch Neurol.* 1998; 55:1539-1543.

- Diaz-Horta O, Kamagate A, Herchuelz A, Van Eylen F.** Na/Ca exchanger overexpression induces endoplasmic reticulum-related apoptosis and caspase-12 activation in insulin-releasing BRIN-BD11 cells. *Diabetes*. 2002;51:1815-1824.
- Di Napoli M, Papa F; Villa Pini Stroke Data Bank Investigators.** Inflammation, hemostatic markers, and antithrombotic agents in relation to long-term risk of new cardiovascular events in first-ever ischemic stroke patients. *Stroke*. 2002;33:1763-1771.
- DiCarlo VS, Chen SJ, Meng QC, Durand J, Yano M, Chen YF, Oparil S.** ETA-receptor antagonist prevents and reverses chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat. *Am J Physiol*. 1995;269:L690-L697.
- Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, Leys D, Matias-Guiu J, Rupprecht HJ; MATCH investigators.** Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004;364:331-337.
- Diener HC, Cunha L, Forbes C, Sivenius J, Smets P, Lowenthal A.** European Stroke Prevention Study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. *J Neurol Sci*. 1996;143:1-13.
- Dietrich WD, Busto R, Halley M, Valdes I.** The importance of brain temperature in alterations of the blood-brain barrier following cerebral ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1990;49:486-497.
- Dietrich WD, Busto R, Valdes I, Loor Y.** Effects of normothermic versus mild hyperthermic forebrain ischemia in rats. *Stroke*. 1990;21:1318-1325.
- Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M.** Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:3717-3720.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA.** Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999;22:391-397.
- Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM.** Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci*. 2003; 26:248-254.
- 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*. 2003;34:2252-2257.

- Donnan GA, Davis SM.** Neuroimaging, the ischaemic penumbra, and selection of patients for acute stroke therapy. *Lancet Neurol.* 2002;1:417
- Downing JE, Miyan JA.** Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol Today.* 2000;21:281-289.
- Duke RJ, Bloch RF, Turpie AG, Trebilcock R, Bayer N.** Intravenous heparin for the prevention of stroke progression in acute partial stable stroke. *Ann Intern Med.* 1986;105:825-828.
- Dunn AJ, Powell ML, Meitin C, Small PA Jr.** Virus infection as a stressor: influenza virus elevates plasma concentrations of corticosterone, and brain concentrations of MHPG and tryptophan. *Physiol Behav.* 1989;45:591-594.
- Dunn AJ, Powell ML, Moreshead WV, Gaskin JM, Hall NR.** Effects of Newcastle disease virus administration to mice on the metabolism of cerebral biogenic amines, plasma corticosterone, and lymphocyte proliferation. *Brain Behav Immun.* 1987;1:216-230.
- Dunn AJ, Welch J.** Stress- and endotoxin-induced increases in brain tryptophan and serotonin metabolism depend on sympathetic nervous system activity. *J Neurochem.* 1991;57:1615-1622.
- Duplain H, Vollenweider L, Delabays A, Nicod P, Bartsch P, Scherrer U.** Augmented sympathetic activation during short-term hypoxia and high-altitude exposure in subjects susceptible to high-altitude pulmonary edema. *Circulation.* 1999;99:1713-1718.
- Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT.** Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1998;273:11619-11624.
- Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA.** Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 1986;137:245-254.
- Dyken ME, Somers VK, Yamada T, Ren ZY, Zimmerman MB.** Investigating the relationship between stroke and obstructive sleep apnea. *Stroke.* 1996;27:401-407.
- Dzeja PP, Holmuhamedov EL, Ozcan C, Pucar D, Jahangir A, Terzic A.** Mitochondria: gateway for cytoprotection. *Circ Res.* 2001;89:744-746
- Easton JD.** Current advances in the management of stroke. *Neurology.* 1998;51: S1-S2.

- Easton JD, Sherman DG.** Management of cerebral embolism of cardiac origin. *Stroke*. 1980;11:433-442.
- Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ.** Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem*. 1995;270:29083-29089.
- Eckardt KU, Koury ST, Tan CC, Schuster SJ, Kaissling B, Ratcliffe PJ, Kurtz A.** Distribution of erythropoietin producing cells in rat kidneys during hypoxic hypoxia. *Kidney Int*. 1993;43:815-823.
- Eckardt KU, Ratcliffe PJ, Tan CC, Bauer C, Kurtz A.** Age-dependent expression of the erythropoietin gene in rat liver and kidneys. *J Clin Invest*. 1992;89:753-760.
- Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Ruther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Siren AL.** Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*. 2002;8:495-505.
- Elizabeth J, Singarayar J, Ellul J, Barer D, Lye M.** Arterial oxygen saturation and posture in acute stroke. *Age Ageing*. 1993;22:269-272.
- Elneihoum AM, Falke P, Axelsson L, Lundberg E, Lindgarde F, Ohlsson K.** Leukocyte activation detected by increased plasma levels of inflammatory mediators in patients with ischemic cerebrovascular diseases. *Stroke*. 1996;27:1734-1738.
- Emerich DF, Dean RL 3rd, Bartus RT.** The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Exp Neurol*. 2002;173:168-181.
- Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, Hallenbeck JM, del Zoppo GJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ, Hopkins SJ.** An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003;139:93-101.
- Emsley HC, Tyrrell PJ.** Inflammation and infection in clinical stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:1399-1419.

- Erren M, Reinecke H, Junker R, Fobker M, Schulte H, Schurek JO, Kropf J, Kerber S, Breithardt G, Assmann G, Cullen P.** Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2355-2363.
- Erslev AJ.** In vitro production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum-free solution. *Blood.* 1974;44:77-85.
- Erslev AJ, Caro J, Kansu E, Silver R.** Renal and extrarenal erythropoietin production in anaemic rats. *Br J Haematol.* 1980;45:65-72.
- Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH.** Hypoxemia in the absence of blood loss or significant hypotension causes inflammatory cytokine release. *Am J Physiol.* 1995;269:R160-R166.
- Esquifino AI, Castrillon PO, Chacon F, Cutrera R, Cardinali DP.** Effect of local sympathectomy on 24-h changes in mitogenic responses and lymphocyte subset populations in rat submaxillary lymph nodes during the preclinical phase of Freund's adjuvant arthritis. *Brain Res.* 2001;888:227-234.
- Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC.** Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol.* 1992;140:539-544.
- Fandrey J, Frede S, Ehleben W, Porwol T, Acker H, Jelkmann W.** Cobalt chloride and desferrioxamine antagonize the inhibition of erythropoietin production by reactive oxygen species. *Kidney Int.* 1997;51:492-496.
- Fandrey J, Seydel FP, Siegers CP, Jelkmann W.** Role of cytochrome P450 in the control of the production of erythropoietin *Life Sci.* 1990;47:127-134.
- Fassbender K, Dempfle CE, Mielke O, Rossol S, Schneider S, Dollman M, Hennerici M.** Proinflammatory cytokines: indicators of infection in high-risk patients. *J Lab Clin Med.* 1997;130:535-539.
- Fassbender K, Rossol S, Kammer T, Daffertshofer M, Wirth S, Dollman M, Hennerici M.** Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J Neurol Sci.* 1994;122:135-139.
- Fehsel K, Kolb-Bachofen V, Kolb H.** Analysis of TNF alpha-induced DNA strand breaks at the single cell level. *Am J Pathol.* 1991;139:251-254.

- Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS, Olschowki JA, Livnat S.** Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev.* 1987;100:225-260.
- Ferrarese C, Mascarucci P, Zoia C, Cavarretta R, Frigo M, Begni B, Sarinella F, Frattola L, De Simoni MG.** Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:1004-1009.
- Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC.** Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1994;6:341-360.
- Feuerstein GZ, Wang X.** Animal models of stroke. *Mol Med Today.* 2000;6:133-135.
- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC.** Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;825:179-193.
- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC.** The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation.* 1998;5:143-159.
- Figuroa YG, Chan AK, Ibrahim R, Tang Y, Burow ME, Alam J, Scandurro AB, Beckman BS.** NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression. *Exp Hematol.* 2002;30:1419-1427.
- Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ.** Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:6496-6500.
- Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ.** Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem.* 1995;270:21021-21027.
- Fisher CM.** The use of anticoagulants in cerebral thrombosis. *Neurology.* 1958;8:311-332.
- Fisher CM.** Lacunes: small, deep cerebral infarcts. *Neurology.* 1998;50:841-852.
- Fisher JW, Birdwell BJ.** Erythropoietin production by the in situ perfused kidney. *Acta Haematol.* 1961;26:224-232.
- Fisher JW, Brookins J.** Adenosine A(2A) and A(2B) receptor activation of erythropoietin production. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;281:F826-F832.
- Fisher JW, Koury S, Ducey T, Mendel S.** Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *Br J Haematol.* 1996;95:27-32.

- Fisher M, Ginsberg M.** Current concepts of the ischemic penumbra: introduction. *Stroke*. 2004;35:2657
- Fisher M, Schaebitz W.** An overview of acute stroke therapy: past, present, and future. *Arch Intern Med*. 2000;160:3196-3206.
- Fishman RA.** Brain edema. *N Engl J Med*. 1975;293:706-711.
- Fitch MT, Silver J.** Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res*. 1997;290:379-384
- Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, Poser RG, Ransohoff J.** Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke*. 1978;9:445-447.
- Flamme I, Risau W.** Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*. 1992;116:435-439.
- Flaris NA, Densmore TL, Molleston MC, Hickey WF.** Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia*. 1993;7:34-40.
- Fletcher EC.** Effect of episodic hypoxia on sympathetic activity and blood pressure. *Respir Physiol*. 2000;119:189-197.
- Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC 3rd, Unger T.** Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension*. 1992;19:555-561.
- Fluck DC.** Chest movements in hemiplegia. *Clin Sci*. 1966;31:383-388.
- Flynn EP, Auer RN.** Eubaric hyperoxemia and experimental cerebral infarction. *Ann Neurol*. 2002;52:566-572.
- Fontana A, Kristensen F, Dubs R, Gemsa D, Weber E.** Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. *J Immunol*. 1982;129:2413-2419.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL.** Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16:4604-4613.
- Foulds KE, Zenewicz LA, Shedlock DJ, Jiang J, Troy AE, Shen H.** Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. *J Immunol*. 2002;168:1528-1532.

- Fowler JC, Gervitz LM, Hamilton ME, Walker JA.** Systemic hypoxia and the depression of synaptic transmission in rat hippocampus after carotid artery occlusion. *J Physiol.* 2003; 550:961-972.
- Fox KA, Mehta SR, Peters R, Zhao F, Lakkis N, Gersh BJ, Yusuf S.** Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent ischemic Events Trial. Benefits and risks of the combination of clopidogrel and aspirin in patients undergoing surgical revascularization for non-ST-elevation acute coronary syndrome: the Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent ischemic Events (CURE) Trial. *Circulation.* 2004;110:1202-1208.
- Fradette C, Bleau AM, Pichette V, Chauret N, Du Souich P.** Hypoxia-induced down-regulation of CYP1A1/1A2 and up-regulation of CYP3A6 involves serum mediators. *Br J Pharmacol.* 2002;137:881-891.
- Fradette C, du Souich P.** Hypoxia-inducible factor-1 and activator protein-1 modulate the upregulation of CYP3A6 induced by hypoxia. *Br J Pharmacol.* 2003;140:1146-1154.
- Fradette C, Du Souich P.** Effect of hypoxia on cytochrome P450 activity and expression. *Curr Drug Metab.* 2004;5:257-271.
- Frerichs KU, Lindsberg PJ, Hallenbeck JM, Feuerstein GZ.** Platelet-activating factor and progressive brain damage following focal brain injury. *J Neurosurg.* 1990;73:223-233.
- Fried R, Meyrick B, Rabinovitch M, Reid L.** Polycythemia and the acute hypoxic response in awake rats following chronic hypoxia. *J Appl Physiol.* 1983;55:1167-1172.
- Fried W.** The liver as a source of extrarenal erythropoietin production. *Blood.* 1972;40:671-677.
- Fried W, Johnson C, Heller P.** Observations on regulation of erythropoiesis during prolonged periods of hypoxia. *Blood.* 1970;36:607-616.
- Friedland RP, Grant S.** Hematocrit, viscosity and cerebral blood flow. *Am Heart J.* 1979;97:404-405.
- Frim DM, Simpson J, Uhler TA, Short MP, Bossi SR, Breakefield XO, Isacson O.** Striatal degeneration induced by mitochondrial blockade is prevented by biologically delivered NGF. *J Neurosci Res.* 1993;35:452-458.

- Fukusaki M, Nakamura T, Miyoshi H, Tamura S, Sumikawa K.** Splanchnic perfusion during controlled hypotension combined with acute hypervolemic hemodilution: a comparison with combination of acute normovolemic hemodilution-gastric intramucosal pH study. *J Clin Anesth.* 2000;12:421-426.
- Furlan M, Marchal G, Viader F, Derlon JM, Baron JC.** Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. *Ann Neurol.* 1996;40:216-226.
- Fuster V.** Coronary artery disease : a clinical-pathological correlation. In: *Syndromes of Atherosclerosis. Correlation of clinical imaging and pathology.* Fuster V, Ed. Armonk, NY, Futura. 1996; pp:1-15.
- Futrell N, Watson BD, Dietrich WD, Prado R, Millikan C, Ginsberg MD.** A new model of embolic stroke produced by photochemical injury to the carotid artery in the rat. *Ann Neurol.* 1988;23:251-257.
- Gadient RA, Cron KC, Otten U.** Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett.* 1990;117:335-340.
- Galante A, Pietroiusti A, Silvestrini M, Stanzione P, Bernardi G.** Leukocyte aggregation: a possible link between infection and ischemic stroke. *Stroke.* 1992;23:1533.
- Garcia JH, Liu KF.** Brain parenchymal responses to experimental focal ischemia: cellular inflammation. In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia.* Kriegstein J, Ed. Stuttgart, Germany: Medpharm Scientific Publishers 1996; pp:379-384.
- Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ.** Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol.* 1994;144:188-199.
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ.** Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke.* 1995;26:627-634.
- Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, Chen S, Chopp M.** Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol.* 1993;142:623-635.

- Gelbard HA, Dzenko KA, DiLoreto D, del Cerro C, del Cerro M, Epstein LG.** Neurotoxic effects of tumor necrosis factor alpha in primary human neuronal cultures are mediated by activation of the glutamate AMPA receptor subtype: implications for AIDS neuropathogenesis. *Dev Neurosci.* 1993;15:417-422.
- Gendron A, Diallo O, Teitelbaum J, du Souich P, Kouassi E.** Systemic hypoxia and the inflammatory response after transient cerebral ischemia in Wistar rats. *Immunology* 2004. Medimond International Proceedings. Collection of free papers presented at the 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS. Volume : Autoimmunity, Genetic and degenerative disorders, malignancies and transplantation. 2004a;pp:103-106.
- Gendron A, Kouassi E, Nuara S, Cossette C, D'Angelo G, Geadah D, du Souich P, Teitelbaum J.** Transient middle cerebral artery occlusion influence on systemic oxygen homeostasis and erythropoiesis in Wistar rats. *Stroke.* 2004b;35:1979-1984.
- Gendron A, Nuara S, Teitelbaum J, Kouassi E.** L'occlusion temporaire de l'artère cérébrale moyenne avec contrôle de la pression artérielle chez le rat, un modèle adéquat pour simuler les accidents vasculaires cérébraux chez l'humain. Journée de la recherche, Département de médecine, Université de Montréal. Mai 1999.
- Gendron A, Teitelbaum J, Cossette C, Nuara S, Dumont M, Geadah D, du Souich P, Kouassi E.** Temporal effects of left versus right middle cerebral artery occlusion on spleen lymphocyte subsets and mitogenic response in Wistar rats. *Brain Res.* 2002;955:85-97.
- Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N.** Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 1997;272:23659-23667.
- Gerhard A, Neumaier B, Elitok E, Glatting G, Ries V, Tomczak R, Ludolph AC, Reske SN.** In vivo imaging of activated microglia using [11C]PK11195 and positron emission tomography in patients after ischemic stroke. *Neuroreport.* 2000;11:2957-2960.
- Geschwind N, Behan P.** Left-handedness: association with immune disease, migraine, and developmental learning disorder. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79:5097-5100.

- Geschwind N, Galaburda AM.** Cerebral lateralization. Biological mechanisms, associations, and pathology: I. A hypothesis and a program for research. *Arch Neurol.* 1985a;42:428-459.
- Geschwind N, Galaburda AM.** Cerebral lateralization. Biological mechanisms, associations, and pathology: II. A hypothesis and a program for research. *Arch Neurol.* 1985b;42:521-552
- Geschwind N, Galaburda AM.** Cerebral lateralization. Biological mechanisms, associations, and pathology: III. A hypothesis and a program for research. *Arch Neurol.* 1985c;42:634-654.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB.** NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-260.
- Gidday JM, Shah AR, Maceren RG, Wang Q, Pelligrino DA, Holtzman DM, Park TS.** Nitric oxide mediates cerebral ischemic tolerance in a neonatal rat model of hypoxic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:331-340.
- Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D.** Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev.* 2002;54:271-284.
- Gillardon F, Lenz C, Kuschinsky W, Zimmermann M.** Evidence for apoptotic cell death in the choroid plexus following focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 1996;207:113-116.
- Gilroy J, Barnhart MI, Meyer JS.** Treatment of acute stroke with dextran 40. *JAMA.* 1969;210:293-298.
- Ginsberg MD.** Pathophysiology and mechanisms of ischemic brain injury. In: *New Approaches to the treatment of ischemic stroke: Part I. Ischemic stroke: A disease update.* Sacco, Ed. Belle Mead, NJ: Excerpta Medica. 1996; pp:11-17.
- Ginsberg, M.D.** Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection. The 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke.* 2003;34:214-223
- Ginsberg MD, Busto R.** Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke.* 1989;20:1627-1642.
- Ginsberg MD, Busto R.** Small animal models of global and focal cerebral ischemia. In *Cerebrovascular Disease: Pathophysiology, Diagnosis and Management.* Ginsberg MD and Bogousslavsky J., Eds. Blackwell Science. 1998; pp:14-35.

- Ginsberg MD, Welsh FA, Budd WW.** Deleterious effect of glucose pretreatment on recovery from diffuse cerebral ischemia in the cat. I. Local cerebral blood flow and glucose utilization. *Stroke*. 1980;11:347-354.
- Giroux C, Scatton B.** Ischemic stroke: treatment on the horizon. *Eur Neurol*. 1996; 36:61-64.
- Giulian D, Li J, Li X, George J, Rutecki PA.** The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS. *Dev Neurosci*. 1994;16:128-136.
- Giulian D, Vaca K.** Inflammatory glia mediate delayed neuronal damage after ischemia in the central nervous system. *Stroke*. 1993;24:184-90.
- Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB.** Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci*. 1988;8:2485-2490.
- Gladstone DJ, Black SE, Hakim AM and the Heart and Stroke Foundation of Ontario Centre of Excellence in Stroke Recovery.** Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke*. 2002;33:2123-2136.
- Glazier SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA.** Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14:545-53.
- Gleadle JM, Ebert BL, Ratcliffe PJ.** Diphenylene iodonium inhibits the induction of erythropoietin and other mammalian genes by hypoxia. Implications for the mechanism of oxygen sensing. *Eur J Biochem*. 1995;234:92-99.
- Glick SD, Zimmerberg B, Jerussi TP.** Adaptive significance of laterality in the rodent. *Ann N Y Acad Sci*. 1977;299:180-185.
- Glick SD, Meibach RC, Cox RD, Maayani S.** Multiple and interrelated functional asymmetries in rat brain. *Life Sci*. 1979;25:395-400.
- Globus MY, Ginsberg MD, Dietrich WD, Busto R, Scheinberg P.** Substantia nigra lesion protects against ischemic damage in the striatum. *Neurosci Lett*. 1987;80:251-256.
- Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF.** Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*. 1988;242:1412-1415.
- Goldstein LB, Davis JN.** Influence of lesion size and location on amphetamine-facilitated recovery of beam-walking in rats. *Behav Neurosci*. 1990;104:320-327.

- Golerick PB.** William M. Feinberg lecture: cognitive vitality and the role of Stroke and Cardiovasculaire disease risk factors. *Stroke*. 2005;36:875-879.
- Gonzalez NC, Wood JG.** Leukocyte-endothelial interactions in environmental hypoxia. *Adv Exp Med Biol*. 2001;502:39-60.
- Good DC, Henkle JQ, Gelber D, Welsh J, Verhulst S.** Sleep-disordered breathing and poor functional outcome after stroke. *Stroke*. 1996;27:252-259.
- Gotoh F, Lechner LL.** In: *Clinical Hemorheology- A new approach to cerebrovascular disease*. International Congress and Symposium series No. 100, Royal Society of Medicine Service Ltd. Wimpole street, London WIM. 1986.
- Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ Jr, Giaccia AJ.** Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol*. 1994;14:6264-6277.
- Graham DI and Brierley JB.** Vascular disorder of the central nervous system. In: *Greenfield's Neuropathology*. J. Hume Adams, JAN. Corsellis, LW Duchen., Eds. Arnold Publisher, London. 1984; pp:158-162.
- Green AR, Ashwood T, Odergren T, Jackson DM.** Nitrones as neuroprotective agents in cerebral ischemia, with particular reference to NXY-059. *Pharmacol Ther*. 2003a;100:195-214.
- Green AR, Cross AJ.** Techniques for examining neuroprotective drugs in vivo. *Int Rev Neurobiol*. 1997;40:47-68.
- Green AR, Odergren T, Ashwood T.** Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends Pharmacol Sci*. 2003b;24:402-408.
- Green SP, Cairns B, Rae J, Errett-Baroncini C, Hongo JA, Erickson RW, Curnutte JT.** Induction of gp91-phox, a component of the phagocyte NADPH oxidase, in microglial cells during central nervous system inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:374-384.
- Greenberg DA.** Calcium channels and calcium channel antagonists. *Ann Neurol*. 1987;21:317-330.
- Greenberg HE, Sica A, Batson D, Scharf SM.** Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol*. 1999;86:298-305.

- Gregersen R, Lambertsen K, Finsen B.** Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:53-65.
- Gregory CJ, Eaves AC.** Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood.* 1977;49:855-864.
- Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ.** GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood.* 1999;94:87-96.
- Grogaard B, Schurer L, Gerdin B, Arfors KE.** Delayed hypoperfusion after incomplete forebrain ischemia in the rat. The role of polymorphonuclear leukocytes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989;9:500-505.
- Grotta J.** Combination therapy stroke trial. rt-PA +/- lubeluzole. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;939:309-310.
- Grotta J.** Neuroprotection is unlikely to be effective in humans using current trial designs. *Stroke.* 2002;33:306-307.
- Grotta J, Ackerman R, Correia J, Fallick G, Chang J.** Whole blood viscosity parameters and cerebral blood flow. *Stroke.* 1982;13:296-301.
- Grotta J, Picone CM, Dedman JR, Rhoades HM, Strong RA, Earls RM, Yao LP.** Neuronal protection correlates with prevention of calcium-calmodulin binding in rats. *Stroke.* 1990;21:III28-III31.
- Guillemin K, Krasnow MA.** The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell.* 1997; 89:9-12.
- Gunter TE, Pfeiffer DR.** Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol.* 1990;258:C755-C786.
- Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ.** Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J Neuroimmunol.* 1993;47:169-176.
- Haas A, Rusk HA, Pelosof H, Adam JR.** Respiratory function in hemiplegic patients. *Arch Phys Med Rehabil.* 1967;48:174-179.
- Hachinski VC, Oppenheimer SM, Wilson JX, Guiraudon C, Cechetto DF.** Asymmetry of sympathetic consequences of experimental stroke. *Arch Neurol.* 1992;49:697-702.

- Hacke W, Kaste M, Olsen TS, Orgogozo JM, Bogousslavsky J.** European Stroke Initiative: recommendations for stroke management. Organisation of stroke care. *J Neurol.* 2000a;247:732-748.
- Hacke W, Kaste M, Skyhoj Olsen T, Orgogozo JM, Bogousslavsky J.** European Stroke Initiative (EUSI) recommendations for stroke management. The European Stroke Initiative Writing Committee. *Eur J Neurol.* 2000b;7:607-623.
- Haddad JJ.** Recombinant human interleukin (IL)-1 beta-mediated regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) stabilization, nuclear translocation and activation requires an antioxidant/reactive oxygen species (ROS)-sensitive mechanism. *Eur Cytokine Netw.* 2002;13:250-260.
- Hakim A.** Physiology and pathology of cerebral ischemia. *Rev Neurol.* 1999;155:631-637.
- Hakim A, Simon R.** Ischemic preconditioning: Introduction. *Stroke.* 2004;35:S 2675
- Hales CA, Kradin RL, Brandstetter RD, Zhu YJ.** Impairment of hypoxic pulmonary artery remodelling by heparin in mice. *Am Rev Respir Dis.* 1983;128:747-751.
- Haley EC Jr, Kassell NF, Torner JC.** Failure of heparin to prevent progression in progressing ischemic infarction. *Stroke.* 1988;19:10-14.
- Halim M, Roffe C.** Effect of nocturnal oxygen saturation on vigilance in patients undergoing rehabilitation from stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2001;11:44.
- Hall ED, Braughler JM.** Central nervous system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 1989;6:303-313.
- Hallenbeck JM.** Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke. *Adv Neurol.* 1996;71:281-297.
- Hallenbeck JM, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Kumaroo KK, Thompson CB, Obrenovitch TP, Contreras TJ.** Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke.* 1986;17:246-253.
- Haller H, Christel C, Dannenberg L, Thiele P, Lindschau C, Luft FC.** Signal transduction of erythropoietin in endothelial cells. *Kidney Int.* 1996;50:481-488.
- Hansen PR.** Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.* 1995;91:1872-1885.

- Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA.** Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:2007-2012.
- Harbison J, James OFW, Gibson GJ, Ford GA.** Sleep apnoea following stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2000;10:67.
- Haring HP, Berg EL, Tsurushita N, Tagaya M, del Zoppo GJ.** E-selectin appears in nonischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia. *Stroke.* 1996;27:1386-1391.
- Harris RJ, Symon L.** Extracellular pH, potassium, and calcium activities in progressive ischaemia of rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1984;4:178-186.
- Harris RJ, Symon L, Branston NM, Bayhan M.** Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981;1:203-209.
- Harrison MJ.** Influence of haematocrit in the cerebral circulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1989;1:55-67.
- Hata R, Maeda K, Hermann D, Mies G, Hossmann KA.** Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:937-946.
- Hayward NJ, McKnight AT, Woodruff GN.** Neuroprotective effect of the kappa-agonist enadoline (CI-977) in rat models of focal cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci.* 1993;5:961-967.
- Hebert PC, Wells G, Blajchman MA, Marshall J, Martin C, Pagliarello G, Tweeddale M, Schweitzer I, Yetisir E.** A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. Transfusion Requirements in Critical Care Investigators, Canadian Critical Care Trials Group. *N Engl J Med.* 1999;340:409-417.
- Hebert PR, Gaziano JM, Chan KS, Hennekens CH.** Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality. An overview of randomized trials. *JAMA.* 1997;278:313-321.
- Heilman KM, Valenstein E (Eds).** *Clinical Neuropsychology*, 3rd Edition, Oxford University Press, New York, 1993; pp:752

- Heindl S, Lehnert M, Criece CP, Hasenfuss G, Andreas S.** Marked sympathetic activation in patients with chronic respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:597-601.
- Heiss WD, Huber M, Fink GR, Herholz K, Pietrzyk U, Wagner R, Wienhard K.** Progressive derangement of periinfarct viable tissue in ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992;12:193-203.
- Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W.** Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 1999;94:1561-1567.
- Henson PM, Bratton DL, Fadok VA.** The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:627-633.
- Higgins JJ, Kammerman LA, Fitz CR.** Predictors of survival and characteristics of childhood stroke. *Neuropediatrics.* 1991;22:190-193.
- Hill JK, Gunion-Rinker L, Kulhanek D, Lessov N, Kim S, Clark WM, Dixon MP, Nishi R, Stenzel-Poore MP, Eckenstein FP.** Temporal modulation of cytokine expression following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* 1999;820:45-54.
- Hilton CJ, Berridge MV.** Conserved region of the cytoplasmic domain is not essential for erythropoietin-dependent growth. *Growth Factors.* 1995;12:263-276.
- Hilton R and Eichholtz F.** The influence of chemical factors on the coronary circulation. *J Physiol.* 1925;59:413-425.
- Hitomi A, Satoh S, Ikegaki I, Suzuki Y, Shibuya M, Asano T.** Hemorheological abnormalities in experimental cerebral ischemia and effects of protein kinase inhibitor on blood fluidity. *Life Sci.* 2000;67:1929-1939.
- Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC.** Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:9493-9498.
- Hosomi N, Mizushige K, Ohyama H, Takahashi T, Kitadai M, Hatanaka Y, Matsuo H, Kohno M, Koziol JA.** Angiotensin-converting enzyme inhibition with enalapril slows progressive intima-media thickening of the common carotid artery in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Stroke.* 2001;32:1539-1545.
- Hossmann KA.** Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res.* 1998;39:106-120.

- Hossmann KA.** The hypoxic brain. Insights from ischemia research. *Adv Exp Med Biol.* 1999;474:155-169.
- Houston JG, Morris AD, Grosset DG, Lees KR, McMillan N, Bone I.** Ultrasonic evaluation of movement of the diaphragm after acute cerebral infarction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995;58:738-741.
- Hsu CY, Liu TH, Xu J, Hogan EL, Chao J, Sun G, Tai HH, Beckman JS, Freeman BA.** Arachidonic acid and its metabolites in cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;559:282-295.
- Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA.** Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245:894-899.
- Hultgren HN, Grover RF.** Circulatory adaptation to high altitude. *Annu Rev Med.* 1968;19:119-152.
- Hussain MA, Puniyani RR.** Hemorheology in cerebrovascular accident: an overview. *J Assoc Physicians India.* 1995;43:283-286.
- Ihle JN.** Cytokine receptor signalling. *Nature.* 1995;377:591-594.
- Ikeda Y, Long DM.** The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery.* 1990;27:1-11.
- Iken K, Chheng S, Fargin A, Goulet AC, Kouassi E.** Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT_{1A} receptors. *Cell Immunol.* 1995;163:1-9.
- Imadojemu VA, Gleeson K, Gray KS, Sinoway LI, Leuenberger UA.** Obstructive apnea during sleep is associated with peripheral vasoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:61-66.
- Imparato AM, Riles TS, Gorstein F.** The carotid bifurcation plaque: pathologic findings associated with cerebral ischemia. *Stroke.* 1979;10:238-245.
- Imparato AM, Riles TS, Mintzer R, Baumann FG.** The importance of hemorrhage in the relationship between gross morphologic characteristics and cerebral symptoms in 376 carotid artery plaques. *Ann Surg.* 1983;197:195-203.
- Inamasu J, Suga S, Sato S, Horiguchi T, Akaji K, Mayanagi K, Kawase T.** Postischemic hypothermia attenuates apoptotic cell death in transient focal ischemia in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2000;76:525-527.

- Intiso D, Zarrelli MM, Lagioia G, Di Rienzo F, Checchia De Ambrosio C, Simone P, Tonali P, Cioffi Dagger RP.** Tumor necrosis factor alpha serum levels and inflammatory response in acute ischemic stroke patients. *Neurol Sci.* 2004;24:390-396.
- Ishigami T.** The influence of psychic acts on the progress of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberculosis.* 1919;2:470-484
- Isler W.** Stroke in childhood and adolescence. *Eur Neurol.* 1984;23:421-424.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr.** HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science.* 2001;292:464-468.
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL.** Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 1998;12:149-162
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ.** Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292:468-472.
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF.** Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature.* 1985;313:806-810.
- Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L.** Role of the kidney in erythropoiesis. 1957. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:589-590.
- Jander S, Kraemer M, Schroeter M, Witte OW, Stoll G.** Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15:42-51.
- Jander S, Pohl J, Gillen C, Schroeter M, Stoll G.** Vascular cell adhesion molecule-1 mRNA is expressed in immune-mediated and ischemic injury of the rat nervous system. *J Neuroimmunol.* 1996;70:75-80.
- Jander S, Schroeter M, D'Urso D, Gillen C, Witte OW, Stoll G.** Focal ischaemia of the rat brain elicits an unusual inflammatory response: early appearance of CD8+ macrophages/microglia. *Eur J Neurosci.* 1998;10:680-688.
- Janoff A.** Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock; effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. *Int Anesthesiol Clin.* 1964;97:251-269.

- Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, Low WC.** Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon. *Neurosurgery*. 1998;43:1382-1396;
- Jeanrenaud X, Bogousslavsky J, Payot M, Regli F, Kappenberger L.** Patent foramen ovale and cerebral infarct in young patients. *Schweiz Med Wochenschr*. 1990;120:823-829.
- Jelkmann W.** Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev*. 1992;72:449-489.
- Jelkmann W.** Biology of erythropoietin. *Clin Investig*. 1994;72:S3-S10.
- Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, Vogt PK.** Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:1749-1753.
- Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL.** Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem*. 1997;272:19253-19260.
- Jiang N, Kowaluk EA, Lee CH, Mazdiyasni H, Chopp M.** Adenosine kinase inhibition protects brain against transient focal ischemia in rats. *Eur J Pharmacol*. 1997;320:131-137
- Jin HK, Yang RH, Chen YF, Thornton RM, Jackson RM, Oparil S.** Hemodynamic effects of arginine vasopressin in rats adapted to chronic hypoxia. *J Appl Physiol*. 1989;66:151-160.
- Johansson BB.** Brain plasticity and stroke rehabilitation. The Willis lecture. *Stroke*. 2000;31:223-230.
- Johnston AJ, Steiner LA, Gupta AK, Menon DK.** Cerebral oxygen vasoreactivity and cerebral tissue oxygen reactivity. *Br J Anaesth*. 2003;90:774-786.
- Jokeit H, Noerpel I, Herbord E, Ebner A.** Heart rate does not decrease after right hemispheric amobarbital injection. *Neurology*. 2000;54:2347-2348.
- Jones AT, Evans TW.** NO: COPD and beyond. *Thorax*. 1997;52:S16-S21.

- Jones L, Griffin S, Palmer S, Main C, Orton V, Sculpher M, Sudlow C, Henderson R, Hawkins N, Riemsma R.** Clinical effectiveness and cost-effectiveness of clopidogrel and modified-release dipyridamole in the secondary prevention of occlusive vascular events: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2004;8:1-210.
- Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, Marcoux FW, FitzGibbon SJ, DeGirolami U, Ojemann RG.** Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg.* 1981;54:773-782.
- Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J.** The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1999;43:860-878.
- Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD.** Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res.* 1998;43:40-49.
- Juul SE, Stallings SA, Christensen RD.** Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of neonates who sustained CNS injury. *Pediatr Res.* 1999;46:543-547.
- Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L.** IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J.* 2003;17:2115-2117.
- Kalaidjieva V.** Development of bone marrow erythroblastic islands in hypoxic rats with intact or damaged kidney tubules. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1998;20:841-848.
- Kalaidjieva V.** Modulation of erythropoiesis in rat bone marrow erythroblastic islands by cyclooxygenase inhibition. *Gen Pharmacol.* 1999;32:423-428.
- Kametsu Y, Osuga S, Hakim AM.** Apoptosis occurs in the penumbra zone during short-duration focal ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:416-422.
- Kandel ER, Schwartz JH.** Directly gated transmission at central synapses. In: *Principles of Neural science*, 3rd ed. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Eds. Norwalk, CT: Appleton & Lange. 1991;pp:153-172.
- Kang DH, Davidson RJ, Coe CL, Wheeler RE, Tomarken AJ, Ershler WB.** Frontal brain asymmetry and immune function. *Behav Neurosci.* 1991;105:860-869.
- Kannel WB, Gordon T, Wolf PA, McNamara P.** Hemoglobin and the risk of cerebral infarction: the Framingham Study. *Stroke.* 1972;3:409-420.

- Kanter MC, Hart RG.** Neurologic complications of infective endocarditis. *Neurology.* 1991;41:1015-1020.
- Kapen S, Park A, Goldberg J.** the incidence and severity of obstructive sleep apnoea in ischemic cerebrovascular disease. *Neurology.* 1991;41:125
- Karibe H, Chen SF, Zarow GJ, Gafni J, Graham SH, Chan PH, Weinstein PR.** Mild intraischemic hypothermia suppresses consumption of endogenous antioxidants after temporary focal ischemia in rats. 1994;649:12-18.
- Karpiak SE, Tagliavia A, Wakade CG.** Animal models for the study of drugs in ischemic stroke. 1989;29:403-414.
- Kasprowicz DJ, Kohm AP, Berton MT, Chruscinski AJ, Sharpe A, Sanders VM.** Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. *J Immunol.* 2000;165:680-690.
- Kato H, Kogure K, Liu XH, Araki T, Itoyama Y.** Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 1996;734:203-212.
- Kato H, Walz W.** The initiation of the microglial response. *Brain Pathol.* 2000;10:137-143.
- Katsura K, Rodriguez de Turco EB, Folbergrova J, Bazan NG, Siesjo BK.** Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis, and phospholipase A2 and C activation during ischemia. *J Neurochem.* 1993;61:1677-1684
- Katzan IL, Furlan AJ, Lloyd LE, Frank JI, Harper DL, Hinchey JA, Hammel JP, Qu A, Sila CA.** Use of tissue-type plasminogen activator for acute ischemic stroke: the Cleveland area experience. *JAMA.* 2000;283:1151-1158.
- Kawaharada M, Urasawa K.** Immunological functions and clinical course of elderly patients with cerebrovascular diseases. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.* 1992;29:652-660.
- Kay R, Wong KS, Yu YL, Chan YW, Tsoi TH, Ahuja AT, Chan FL, Fong KY, Law CB, Wong A.** Low-molecular-weight heparin for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333:1588-1593.
- Kazmierski R, Guzik P, Ambrosius W, Ciesielska A, Moskal J, Kozubski W.** Predictive value of white blood cell count on admission for in-hospital mortality in acute stroke patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2004;107:38-43.

- Kazmierski R, Guzik P, Ambrosius W, Kozubski W.** Leukocytosis in the first day of acute ischemic stroke as a prognostic factor of disease progression. *Wiad Lek.* 2001;54:143-151.
- Khaspekov L, Shamloo M, Victorov I, Wieloch T.** Sublethal in vitro glucose-oxygen deprivation protects cultured hippocampal neurons against a subsequent severe insult. *Neuroreport.* 1998;9:1273-1276.
- Kidwell CS, Alger JR, Saver JL.** Evolving paradigms in neuroimaging of the ischemic penumbra. *Stroke.* 2004;35:2662-2665.
- Kiely DK, Wolf PA, Cupples LA, Beiser AS, Myers RH.** Familial aggregation of stroke. The Framingham Study. *Stroke.* 1993;24:1366-1371.
- Kim JS.** Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci.* 1996;137:69-78.
- Kim JS, Yoon SS, Kim YH, Ryu JS.** Serial measurement of interleukin-6, transforming growth factor-beta, and S-100 protein in patients with acute stroke. *Stroke.* 1996;27:1553-1557.
- Kin KL, Mao XO, Nagayama T, Goldsmith PC, Greenberg DA.** Induction of vascular endothelial growth factor receptors and phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling by global cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience.* 2000;100:713-717.
- Kinouchi H, Sharp FR, Hill MP, Koistinaho J, Sagar SM, Chan PH.** Induction of 70-kDa heat shock protein and hsp70 mRNA following transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993;13:105-115.
- Kirino T, Tamura A, Sano K.** Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 1984;64:139-147.
- Kirino T, Tsujita Y, Tamura A.** Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991;11:299-307.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K.** 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res.* 1990;528:21-24.
- Kivirikko KI, Pihlajaniemi T.** Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1998;72:325-398.

- Kiwak KJ, Moskowitz MA, Levine L.** Leukotriene production in gerbil brain after ischemic insult, subarachnoid hemorrhage, and concussive injury. *J Neurosurg.* 1985;62:865-869.
- Kiyohara Y, Fujishima M, Ishitsuka T, Tamaki K, Sadoshima S, Omae T.** Effects of hematocrit on brain metabolism in experimentally induced cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Stroke.* 1985;16:835-840.
- Klingelhofer J, Sander D.** Cardiovascular consequences of clinical stroke. *Baillieres Clin Neurol.* 1997;6:309-335.
- Knöferl MW, Jarrar D, Schwacha MG, Angele MK, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH.** Severe hypoxemia in the absence of blood loss causes a gender dimorphic immune response. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279:C2004-C2010.
- Knowles R, Keeping H, Graeber T, Nguyen K, Garner C, D'Amico R, Simms HH.** Cytokine control of PMN phagocytosis: regulatory effects of hypoxemia and hypoxemia-reoxygenation. *Am J Physiol.* 1997;272:C1352-C1364.
- Knowles R, Keeping H, Nguyen K, Garner C, D'Amico R, Simms HH.** Hypoxemia up-regulates interleukin-8 stimulated phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes by differential regulation of CD32w and CD35 messenger RNA expression. *Surgery.* 1995;118:177-183.
- Kobayashi S, Millhorn DE.** Stimulation of expression for the adenosine A2A receptor gene by hypoxia in PC12 cells. A potential role in cell protection. *J Biol Chem.* 1999;274:20358-20365.
- Kochanek PM, Hallenbeck JM.** Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke.* 1992;23:1367-1379.
- Kochler RC.** Large animal models of focal and global ischemia . In *Cerebrovascular Disease: Pathophysiology, Diagnosis and Management.* Ginsberg MD, Bo Bogousslavsky J, eds. Malden, Mass: Blackwell Scientific Publications. 1998;pp:36-51.
- Kohler J, Kasper J, Witt I, von Reutern GM.** Ischemic stroke due to protein C deficiency. *Stroke.* 1990;21:1077-1080.
- Kohm AP, Sanders VM.** Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. *Immunol Today.* 2000;21:539-542.

- Kohm AP, Sanders VM.** Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol Rev.* 2001;53:487-525.
- Kohno K, Hoehn-Berlage M, Mies G, Back T, Hossmann KA.** Relationship between diffusion-weighted MR images, cerebral blood flow, and energy state in experimental brain infarction. *Magn Reson Imaging.* 1995;13:73-80.
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G.** Experimental studies of ischemic brain edema: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke.* 1986;8:1-8.
- Konishi Y, Chui DH, Hirose H, Kunishita T, Tabira T.** Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res.* 1993;609:29-35.
- Konsman JP, Parnet P, Dantzer R.** Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci.* 2002;25:154-159.
- Korpelainen JT, Sotaniemi KA, Makikallio A, Huikuri HV, Myllyla VV.** Dynamic behavior of heart rate in ischemic stroke. *Stroke.* 1999;30:1008-1013.
- Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J, Kato Y.** Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem.* 1999;72:2565-2572.
- Kostulas N, Pelidou SH, Kivisakk P, Kostulas V, Link H.** Increased IL-1beta, IL-8, and IL-17 mRNA expression in blood mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study. *Stroke.* 1999;30:2174-2179.
- Kourembanas S, Morita T, Liu Y, Christou H.** Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney Int.* 1997; 51:438-443.
- Koury MJ, Bondurant MC, Atkinson JB.** Erythropoietin control of terminal erythroid differentiation: maintenance of cell viability, production of hemoglobin, and development of the erythrocyte membrane. *Blood Cells.* 1987;13:217-226.
- Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ.** Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood.* 1988;71:524-527.
- Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL.** Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood.* 1991;77:2497-24503.
- Krantz SB.** Erythropoietin. *Blood.* 1991;77:419-434.

- Kremer C, Breier G, Risau W, Plate KH.** Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res.* 1997;57:3852-3859.
- Kreutzberg GW.** Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996;19:312-318.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M.** The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:619-642.
- Kubatzky KF, Ruan W, Gurezka R, Cohen J, Ketteler R, Watowich SS, Neumann D, Langosch D, Klingmuller U.** Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr Biol.* 2001;11:110-115.
- Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N.** An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke.* 1982;13:505-508.
- Kumar M, Liu GJ, Floyd RA, Grammas P.** Anoxic injury of endothelial cells increases production of nitric oxide and hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;219:497-501.
- Kuratowska Z, Lewartowski B, Michalak E.** Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs. *Blood.* 1961;18:527-534.
- Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossmann KA.** Prevention of postischemic hyperthermia prevents ischemic injury of CA1 neurons in gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990;10:550-556.
- Kusaka I, Kusaka G, Zhou C, Ishikawa M, Nanda A, Granger DN, Zhang JH, Tang J.** Role of AT1 receptors and NAD(P)H oxidase in diabetes-aggravated ischemic brain injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H2442-H2451.
- Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M.** The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:4542-4550.
- LaHoste GJ, Neveu PJ, Mormede P, Le Moal M.** Hemispheric asymmetry in the effects of cerebral cortical ablations on mitogen-induced lymphoproliferation and plasma prolactin levels in female rats. *Brain Res.* 1989;483:123-129.
- Lacasse Y, Brooks D, Goldstein RS.** Trends in the epidemiology of COPD in Canada, 1980 to 1995. COPD and Rehabilitation Committee of the Canadian Thoracic Society. *Chest.* 1999;116:306-313.

- Lacombe C, Mayeux P.** The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14:22-28.
- Lahiri S, Di Giulio C, Roy A.** Lessons from chronic intermittent and sustained hypoxia at high altitudes. *Respir Physiol Neurobiol.* 2002;130:223-233.
- Lahiri S, Rozanov C, Roy A, Storey B, Buerk DG.** Regulation of oxygen sensing in peripheral arterial chemoreceptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:755-774.
- Lange P, Groth S, Nyboe J, Appleyard M, Mortensen J, Jensen G, Schnohr P.** Chronic obstructive lung disease in Copenhagen: cross-sectional epidemiological aspects. *J Intern Med.* 1989;226:25-32.
- Lapchak PA, Araujo DM.** Therapeutic Potential of Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonists in the Management of Ischemic Stroke. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2003;3:87-94.
- Laughlin MH, Korthuis RJ, Duncker DJ, Bache RJ.** Control of blood flow to cardiac and skeletal muscle during exercise. In: *Handbook of Physiology. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems.* Rowell LB and Shepherd JT, Eds. American Physiological Society, Bethesda, MD, USA. 1996;12:705-769.
- Lawson AE, Bao H, Wickrema A, Jacobs-Helber SM, Sawyer ST.** Phosphatase inhibition promotes antiapoptotic but not proliferative signaling pathways in erythropoietin-dependent HCD57 cells. *Blood.* 2000;96:2084-2092.
- Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A, Johns RA.** Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol.* 1996;270:L164-L170.
- Ledbetter DJ, Juul SE.** Erythropoietin and the incidence of necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *J Pediatr Surg.* 2000;35:178-181.
- Lee MC, Klassen AC, Resch JA.** Respiratory pattern disturbances in ischemic cerebral vascular disease. *Stroke.* 1974;5:612-616.
- Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM.** Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem.* 1997;272:5375-5381.
- Lee RG, van Donkelaar P.** Mechanisms underlying functional recovery following stroke. *Can J Neurol Sci.* 1995;22:257-263.

- Lee TH, Kato H, Kogure K, Itoyama Y.** Temporal profile of nerve growth factor-like immunoreactivity after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1996;713:199-210.
- Lees GJ.** The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *J Neurol Sci.* 1993;114:119-122.
- Lehrmann E, Christensen T, Zimmer J, Diemer NH, Finsen B.** Microglial and macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *J Comp Neurol.* 1997;386:461-476.
- Lehrmann E, Kiefer R, Christensen T, Toyka KV, Zimmer J, Diemer NH, Hartung HP, Finsen B.** Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor-beta1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Glia.* 1998;24:437-448.
- Leon LR, Kozak W, Kluger MJ.** Role of IL-10 in inflammation. Studies using cytokine knockout mice. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;856:69-75.
- Leuenberger U, Gleeson K, Wroblewski K, Prophet S, Zelis R, Zwillich C, Sinoway L.** Norepinephrine clearance is increased during acute hypoxemia in humans. *Am J Physiol.* 1991;261:H1659-H1664.
- Lhermitte F, Gautier JC, Derouesne C.** Nature of occlusions of the middle cerebral artery. *Neurology.* 1970;20:82-88.
- Li H, Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Oparil S, Elton TS.** Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol.* 1994;77:1451-1459.
- Li Y, Chopp M, Zhang ZG, Zhang RL.** Expression of glial fibrillary acidic protein in areas of focal cerebral ischemia accompanies neuronal expression of 72-kDa heat shock protein. *J Neurol Sci.* 1995;128:134-142.
- Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F.** Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev.* 1996;10:154-164.
- Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z.** Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82:7580-7584.

- Lindsberg PJ, Yue TL, Frerichs KU, Hallenbeck JM, Feuerstein G.** Evidence for platelet-activating factor as a novel mediator in experimental stroke in rabbits. *Stroke*. 1990;21:1452-1457.
- Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjo BK, Persson H.** Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:648-652.
- Linnik MD, Miller JA, Sprinkle-Cavallo J, Mason PJ, Thompson FY, Montgomery LR, Schroeder KK.** Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995;32:116-124.
- Liu C, Shen K, Liu Z, Noguchi CT.** Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem*. 1997;272:32395-32400.
- Liu D, Cheng T, Guo H, Fernandez JA, Griffin JH, Song X, Zlokovic BV.** Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat Med*. 2004;10:1379-1383.
- Liu M, Hurn PD, Alkayed NJ.** Cytochrome P450 in neurological disease. *Curr Drug Metab*. 2004;5:225-234.
- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ.** Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke*. 1994;25:1481-1488.
- Liu T, McDonnell PC, Young PR, White RF, Siren AL, Hallenbeck JM, Barone FC, Feuerstein GZ.** Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke*. 1993;24:1746-1750.
- Liu Y, Christou H, Morita T, Laughner E, Semenza GL, Kourembanas S.** Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer. *J Biol Chem*. 1998;273:15257-15262.
- Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S.** Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*. 1995; 77:638-643.

- Liu Y, Kato H, Nakata N, Kogure K.** Protection of rat hippocampus against ischemic neuronal damage by pretreatment with sublethal ischemia. *Brain Res.* 1992; 586:121-124.
- Liu ZY, Chin K, Noguchi CT.** Tissue specific expression of human erythropoietin receptor in transgenic mice. *Dev Biol.* 1994;166:159-169.
- Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA.** Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science.* 1999;283:987-990.
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA.** Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4:399-415.
- Lo EH, Moskowitz MA, Jacobs TP.** Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. *Stroke.* 2005;36:189-192.
- Lo SC, Agar NS.** NADH-methemoglobin reductase activity in the erythrocytes of newborn and adult mammals. *Experientia.* 1986;42:1264-1265.
- Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ.** Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:176-179.
- Loddick SA, Rothwell NJ.** Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:932-940.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R.** Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20:84-91.
- Love S.** Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 1999;9:119-131.
- Lusby RJ, Ferrell LD, Ehrenfeld WK, Stoney RJ, Wylie EJ.** Carotid plaque hemorrhage. Its role in production of cerebral ischemia. *Arch Surg.* 1982;117:1479-1488.
- Lyden P, Jacoby M, Schim J, Albers G, Mazzeo P, Ashwood T, Nordlund A, Odergren T.** The Clomethiazole Acute Stroke Study in tissue-type plasminogen activator-treated stroke (CLASS-T): final results. *Neurology.* 2001;57:1199-1205.
- Lyden PD, Lonzo L.** Combination therapy protects ischemic brain in rats. A glutamate antagonist plus a gamma-aminobutyric acid agonist. *Stroke.* 1994 Jan;25:189-196.

- Mackay CR, von Andrian UH.** Immunology. Memory T cells--local heroes in the struggle for immunity. *Science*. 2001;291:2323-2324
- Mackay KB, Kusumoto K, Graham DI, McCulloch J.** Focal cerebral ischemia in the cat: pretreatment with a kappa-1 opioid receptor agonist, CI-977. *Brain Res*. 1993;618:213-219.
- MacMillan V, Siesjo BK.** Critical oxygen tensions in the brain. *Acta Physiol Scand*. 1971;82:412-414.
- Macrae IM.** New models of focal cerebral ischemia. *Br J Clin Pharmacol*. 1992;34 :302-308.
- Maher J, Hachinski V.** Hypothermia as a potential treatment for cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1993;5:277-300.
- Maier CM, Ahern K, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK.** Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. *Stroke*. 1998;29:2171-2180.
- Maier SF, Goehler LE, Fleshner M, Watkins LR.** The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;840:289-300.
- Marchal G, Beaudouin V, Rioux P, de la Sayette V, Le Doze F, Viader F, Derlon JM, Baron JC.** Prolonged persistence of substantial volumes of potentially viable brain tissue after stroke: a correlative PET-CT study with voxel-based data analysis. *Stroke*. 1996;27:599-606.
- Marshall JM.** Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiol Rev*. 1994;74:543-594.
- Marshall JW, Ridley RM.** Assessment of functional impairment following permanent middle cerebral artery occlusion in a non-human primate species. *Neurodegeneration*. 1996;5:275-286
- Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Trentz O, Bauer C.** Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int*. 1997;51:416-418.
- Marti HH, Risau W.** Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:15809-15814.

- Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M.** Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci.* 1996;8:666-676.
- Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W.** Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol.* 2000;156:965-976.
- Martinou JC, Green DR.** Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:63-7.
- Masek K, Kadkecov O, Petrovicky AP.** The effects of brain stem lesions on the immune response. In: *Advances in immunopharmacology 2*, Hadden JW, Chedid L, Dukor P, Spreafico F and Willoughby D, Eds. Pergamon Press: New York. 1982; pp:443-450.
- Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrancois L.** Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science.* 2001;291:2413-2417.
- Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F Jr, Tabira T, Sasaki R.** Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem.* 1993;268:11208-11216.
- Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R.** A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem.* 1994;269:19488-19493.
- Matchar DB.** The value of stroke prevention and treatment. *Neurology.* 1998;51:S31-35.
- Matsumoto K, Graf R, Rosner G, Taguchi J, Heiss WD.** Elevation of neuroactive substances in the cortex of cats during prolonged focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993;13:586-594.
- Matsushima K, Hakim AM.** Transient forebrain ischemia protects against subsequent focal cerebral ischemia without changing cerebral perfusion. *Stroke.* 1995;26:1047-1052.
- Mattson MP, Cheng B.** Growth factors protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Stroke.* 1993;24: 1136-140.

- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ.** The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999;399:271-275.
- Mayeux P, Lacombe C, Casadevall N, Chretien S, Dusanter I, Gisselbrecht S.** Structure of the murine erythropoietin receptor complex. Characterization of the erythropoietin cross-linked proteins. *J Biol Chem*. 1991;266:23380-23385.
- Mayne EE, Bridges JM, Weaver JA.** Platelet adhesiveness, plasma fibrinogen and factor 8 levels in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1970;6:436-440.
- Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ.** Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood*. 1997;90:3322-3331.
- McAuley MA.** Rodent models of focal ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1995;7:153-180.
- McCord JM.** Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985;312:159-163.
- McKay LI, Cidlowski JA.** Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev*. 1999;20:435-459.
- McMahon SM, Heyman A.** The mechanics of breathing and stabilization of ventilation in patients with unilateral cerebral infarction. *Stroke*. 1974;5:518-527.
- McMahon TJ, Moon RE, Luschinger BP, Carraway MS, Stone AE, Stolp BW, Gow AJ, Pawloski JR, Watke P, Singel DJ, Piantadosi CA, Stamler JS.** Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med*. 2002;8:711-717.
- McPherson RW, Zeger S, Traystman RJ.** Relationship of somatosensory evoked potentials and cerebral oxygen consumption during hypoxic hypoxia in dogs. *Stroke*. 1986;17:30-36.
- Meador KJ, De Lecuona JM, Helman SW, Loring DW.** Differential immunologic effects of language-dominant and nondominant cerebral resections. *Neurology*. 1999;52:1183-1187.

- Megyesi J, Di Mari J, Udvarhelyi N, Price PM, Safirstein R.** DNA synthesis is dissociated from the immediate-early gene response in the post-ischemic kidney. *Kidney Int.* 1995;48:1451-1458.
- Meistrell ME 3rd, Botchkina GI, Wang H, Di Santo E, Cockcroft KM, Bloom O, Vishnubhakat JM, Ghezzi P, Tracey KJ.** Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock.* 1997;8:341-348.
- Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L.** A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med.* 1995;182:1683-1693.
- Melillo G, Taylor LS, Brooks A, Musso T, Cox GW, Varesio L.** Functional requirement of the hypoxia-responsive element in the activation of the inducible nitric oxide synthase promoter by the iron chelator desferrioxamine. *J Biol Chem.* 1997;272:12236-12243.
- Melmon KL, Bourne HR, Weinstein Y, Shearer GM, Kram J, Bauminger S.** Hemolytic plaque formation by leukocytes in vitro. Control by vasoactive hormones. *J Clin Invest.* 1974;53:13-21.
- Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK.** Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 1992;23:552-559.
- Mentzer RM Jr, Rubio R, Berne RM.** Release of adenosine by hypoxic canine lung tissue and its possible role in pulmonary circulation. *Am J Physiol.* 1975;229:1625-1631.
- Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A.** Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis.* 2004;19:151-167.
- Meyer S, Strittmatter M, Fischer C, Georg T, Schmitz B.** Lateralization in autonomic dysfunction in ischemic stroke involving the insular cortex. *Neuroreport.* 2004;15:357-361.
- Miljkovic-Lolic M, Silbergleit R, Fiskum G, Rosenthal RE.** Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity. *Brain Res.* 2003;971:90-94.
- Milledge JS, Cotes PM.** Serum erythropoietin in humans at high altitude and its relation to plasma renin. *J Appl Physiol.* 1985;59:360-364.

- Miller B, Sarantis M, Traynelis SF, Attwell D.** Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. *Nature*. 1992;355:722-725.
- Miller BA, Barber DL, Bell LL, Beattie BK, Zhang MY, Neel BG, Yoakim M, Rothblum LI, Cheung JY.** Identification of the erythropoietin receptor domain required for calcium channel activation. *J Biol Chem*. 1999;274:20465-20472.
- Miller BA, Perez RS, Shah AR, Gonzales ER, Park TS, Gidday JM.** Cerebral protection by hypoxic preconditioning in a murine model of focal ischemia-reperfusion. *Neuroreport*. 2001;12:1663-1669.
- Miller JD, Bullock R, Graham DI, Chen MH, Teasdale GM.** Ischemic brain damage in a model of acute subdural hematoma. *Neurosurgery*. 1990;27:433-439.
- Miller RJ.** Multiple calcium channels and neuronal function. *Science*. 1987;235:46-52.
- Millikan C.** Animal stroke models. *Stroke*. 1992;23:795-797.
- Minamino T, Kitakaze M, Komamura K, Node K, Takeda H, Inoue M, Hori M, Kamada T.** Activation of protein kinase C increases adenosine production in the hypoxic canine coronary artery through the extracellular pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:2298-22304.
- Miura O, D'Andrea A, Kabat D, Ihle JN.** Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Mol Cell Biol*. 1991;11:4895-4902.
- Miyake T, Kung CK, Goldwasser E.** Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*. 1977;252:5558-5564.
- Miyamoto O, Auer RN.** Hypoxia, hyperoxia, ischemia, and brain necrosis. *Neurology*. 2000;54:362-371.
- Mody I, MacDonald JF.** NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16:356-359.
- Mohiuddin AA, Bath FJ, Bath PMW.** Theophylline, aminophylline, caffeine and analogues for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*2000;2: CD000211.
- Mohr JP, Gautier JC, Hier D, Stein RW.** Middle cerebral artery. In: *stroke, Vol.1: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Barnett, HJM, Stein BM, Mohr JP, Yatsu EM, Eds. Churchill Livingstone, New York. 1986; pp:377-450.

- Mohr JP, Thompson JL, Lazar RM, Levin B, Sacco RL, Furie KL, Kistler JP, Albers GW, Pettigrew LC, Adams HP Jr, Jackson CM, Pullicino P.** Warfarin-Aspirin Recurrent Stroke Study Group. A comparison of warfarin and aspirin for the prevention of recurrent ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2001;345:1444-1451.
- Mohsenin V, Valor R.** Sleep apnea in patients with hemispheric stroke. *Arch Phys Med Rehabil.* 1995;76:71-76.
- Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, Altieri M, van Melle G.** Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology.* 2000;54:2089-2094.
- Moraes D, Loscalzo J.** Pulmonary hypertension: newer concepts in diagnosis and management. *Clin Cardiol.* 1997;20:676-682.
- Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ.** Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Comp Neurol.* 1993;327:123-132.
- Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R.** Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience.* 1997;76:105-116.
- Morishita E, Narita H, Nishida M, Kawashima N, Yamagishi K, Masuda S, Nagao M, Hatta H, Sasaki R.** Anti-erythropoietin receptor monoclonal antibody: epitope mapping, quantification of the soluble receptor, and detection of the solubilized transmembrane receptor and the receptor-expressing cells. *Blood.* 1996;88:465-471.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D.** Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron.* 1994;13:1071-1082.
- Moulder JE, Rockwell S.** Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 1987;5:313-341.
- Mucke HAM.** Outlook for neuroprotectants: Next-Generation therapies for stroke, traumatic brain injury, and spinal cord injury. Decision resources Inc. 2000;DR Reports:1-69.
- Muir KW, Weir CJ, Alwan W, Squire IB, Lees KR.** C-reactive protein and outcome after ischemic stroke. *Stroke.* 1999;30:981-985.
- Mulla A, Buckingham JC.** Regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by cytokines. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 1999;13:503-521.

- Munell F, Burke RE, Bandele A, Gubits RM.** Localization of c-fos, c-jun, and hsp70 mRNA expression in brain after neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994;77:111-121.
- Murray DR, Polizzi SM, Harris TJ, Maisel AS.** Myocardial ischemia alters immunoregulatory cell traffic and function in the rat independent of exogenous catecholamine administration. *J Neuroimmunol.* 1996;71:107-113.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA.** Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-1136.
- Muta K, Krantz SB, Bondurant MC, Wickrema A.** Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. *J Clin Invest.* 1994;94:34-43.
- Mutisya EM, Bowling AC, Beal MF.** Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1994;63:2179-2184.
- Nadareishvili Z, Hallenbeck J.** Neuronal regeneration after stroke. *N Engl J Med* 2003;348:2355-2356.
- Naeije R.** Pulmonary circulation at high altitude. *Respiration.* 1997;64:429-434.
- Nagahiro S, Goto S, Korematsu K, Sumi M, Takahashi M, Ushio Y.** Disruption of the blood-cerebrospinal fluid barrier by transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 1994;633:305-311.
- Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU.** Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60:386-392.
- Naldini A, Carraro F, Bocci V.** Effects of hypoxia on the antiproliferative activity of human interferons. *J Interferon Cytokine Res.* 1995;15:137-142.
- Naldini A, Carraro F, Fleischmann WR Jr, Bocci V.** Hypoxia enhances the antiviral activity of interferons. *J Interferon Res.* 1993;13:127-132.
- Naldini A, Carraro F, Silvestri S, Bocci V.** Hypoxia affects cytokine production and proliferative responses by human peripheral mononuclear cells. *J Cell Physiol.* 1997;173:335-42.
- Naldini A, Cesari S, Bocci V.** Effects of hypoxia on the cytotoxicity mediated by tumor necrosis factor-alpha. *Lymphokine Cytokine Res.* 1994;13:233-237.

- Naldini A, Pucci A, Carraro F.** Hypoxia induces the expression and release of interleukin 1 receptor antagonist in mitogen-activated mononuclear cells. *Cytokine* 2001;13:334-341.
- Nasr-Wyler A, Bouillanne O, Lalhou A, Goldenberg F, Bissery A, Piette F.** Sleep apnea syndrome and stroke in the elderly population. *Rev Neurol.* 1999;155:1057-1062.
- Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, Hallenbeck JM.** TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17:483-490.
- Nedergaard M, Diemer NH.** Focal ischemia of the rat brain, with special reference to the influence of plasma glucose concentration. *Acta Neuropathol.* 1987;73:131-137.
- Neubauer H, Cumano A, Muller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K.** Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell.* 1998;93:397-409.
- Neveu PJ.** Cerebral neocortex modulation of immune functions. *Life Sci.* 1988;42:1917-1923.
- Neveu PJ.** Asymmetrical brain modulation of the immune response. *Brain Res Brain Res Rev.* 1992;17:101-107.
- Neveu PJ, Barneoud P, Georgiades O, Vitiello S, Vincendeau P, Le Moal M.** Brain neocortex influence on the mononuclear phagocyte system. *J Neurosci Res.* 1989b;22:188-193.
- Neveu PJ, Barneoud P, Vitiello S, Kelley KW, Le Moal MA.** Brain neocortex modulation of mitogen-induced interleukin 2, but not interleukin 1, production. *Immunol Lett.* 1989a;21:307-310.
- Neveu PJ, Betancur C, Barneoud P, Vitiello S, Le Moal M.** Functional brain asymmetry and lymphocyte proliferation in female mice: effects of right and left cortical ablation. *Brain Res.* 1991;550:125-128.
- Neveu PJ, Deleplanque B, Vitiello S, Rouge-Pont F, Le Moal M.** Hemispheric asymmetry in the effects of substantia nigra lesioning on lymphocyte reactivity in mice. *Int J Neurosci.* 1992;64:267-273.
- Neveu PJ, Delrue C, Deleplanque B, D'Amato FR, Puglisi-Allegra S, Cabib S.** Influence of brain and behavioral lateralization in brain. Monoaminergic, neuroendocrine, and immune stress responses. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;741:271-282.

- Neveu PJ, Taghzouti K, Dantzer R, Simon H, Le Moal M.** Modulation of mitogen-induced lymphoproliferation by cerebral neocortex. *Life Sci.* 1986;38:1907-1913.
- Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC.** Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell.* 1994;79:353-364.
- Nilsson L, Siesjo BK.** The effect of phenobarbitone anaesthesia on blood flow and oxygen consumption in the rat brain. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 1975;57:18-24.
- Nishi S, Taki W, Uemura Y, Higashi T, Kikuchi H, Kudoh H, Satoh M, Nagata K.** Ischemic tolerance due to the induction of HSP70 in a rat ischemic recirculation model. *Brain Res.* 1993;615:281-288.
- Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H.** ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* 2002;16:1345-1355.
- Nudo RJ, Milliken GW.** Reorganization of movement representations in primary motor cortex following focal ischemic infarcts in adult squirrel monkeys. *J Neurophysiol.* 1996;75:2144-2149.
- Nudo RJ, Wise BM, SiFuentes F, Milliken GW.** Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science.* 1996;272:1791-1794.
- O'Brien ER, Schwartz SM.** A new view of restenosis. In: Syndrome of Atherosclerosis. Correlation of clinical imaging and pathology. Fuster V, ed. Armonk, NY, Futura. 1996; pp:485-505.
- Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, Pulido SM, Liu C, Ruegg UT, Noguchi CT.** Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem.* 2000;275:39754-39761.
- Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG.** Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol.* 2000;2:423-427.
- Ohneda O, Yanai N, Obinata M.** Erythropoietin as a mitogen for fetal liver stromal cells which support erythropoiesis. *Exp Cell Res.* 1993;208:327-331.

- Oka M, Morris KG, McMurtry IF.** NIP-121 is more effective than nifedipine in acutely reversing chronic pulmonary hypertension. *J Appl Physiol.* 1993;75:1075-1080.
- Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, del Zoppo GJ.** P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke.* 1994;25:202-211.
- Onal MZ, Li F, Tatlisumak T, Locke KW, Sandage BW Jr, Fisher M.** Synergistic effects of citicoline and MK-801 in temporary experimental focal ischemia in rats. *Stroke.* 1997 May;28(5):1060-5.
- Ooiwa Y, Uematsu Y, Terada T, Nakai K, Itakura T, Komai N, Moriwaki H.** Cerebral blood flow in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes. *Stroke.* 1993;24:304-309.
- Oppenheim JJ, Mizel SB, Meltzer MS.** Comparison of lymphocyte and mononuclear phagocyte derived mitogenic "amplification" factors. In: *Biology of the lymphokines.* Cohen S, Pick E and Oppenheim JJ, Eds. Academic Press: New York. 1979;pp:291-323.
- Ori C, Ceschin C.** Energy state of hypoxic brain. *Minerva Anesthesiol.* 1994;60:509-512.
- Osborne KA, Shigeno T, Balarsky AM, Ford I, McCulloch J, Teasdale GM, Graham DI.** Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1987;50:402-410.
- Ostadal B, Ressler J, Urbanova D, Widimsky J, Prochazka J, Pelouch V.** The effect of beta adrenergic blockade on pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy and polycythaemia, induced in rats by intermittent high altitude hypoxia. *Basic Res Cardiol.* 1978;73:422-432.
- Ou LC, Salceda S, Schuster SJ, Dunnack LM, Brink-Johnsen T, Chen J, Leiter JC.** Polycythemic responses to hypoxia: molecular and genetic mechanisms of chronic mountain sickness. *J Appl Physiol.* 1998;84:1242-1251.
- Ouellette AJ, Malt RA, Sukhatme VP, Bonventre JV.** Expression of two "immediate early" genes, Egr-1 and c-fos, in response to renal ischemia and during compensatory renal hypertrophy in mice. *J Clin Invest.* 1990;85:766-771.
- Ouyang YB, Tan Y, Comb M, Liu CL, Martone ME, Siesjo BK, Hu BR.** Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cytochrome C and Activation of caspase-like proteases. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:1126-1135.

- Overgaard K, Sereghy T, Boysen G, Pedersen H, Diemer NH.** Reduction of infarct volume by thrombolysis with rt-PA in an embolic rat stroke model. *Scand J Clin Lab Invest.* 1993;53:383-393.
- Overgaard K, Sereghy T, Boysen G, Pedersen H, Hoyer S, Diemer NH.** A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992;12:484-490.
- Ozaki T, Katsumoto E, Mui K, Furutsuka D, Yamagami S.** Distribution of Fos- and Jun-related proteins and activator protein-1 composite factors in mouse brain induced by neuroleptics. *Neuroscience.* 1998;84:1187-1196.
- Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA.** Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol.* 1998;274:L212-219.
- Palmer GC, Peeling J, Corbett D, Del Bigio MR, Hudzik TJ.** T2-weighted MRI correlates with long-term histopathology, neurology scores, and skilled motor behavior in a rat stroke model. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;939:283-296.
- Papadopoulos SM, Chandler WF, Salamat MS, Topol EJ, Sackellares JC.** Recombinant human tissue-type plasminogen activator therapy in acute thromboembolic stroke. *J Neurosurg.* 1987;67:394-398.
- Pappata S, Levasseur M, Gunn RN, Myers R, Crouzel C, Syrota A, Jones T, Kreutzberg GW, Banati RB.** Thalamic microglial activation in ischemic stroke detected in vivo by PET and [¹¹C]PK1195. *Neurology.* 2000;55:1052-1054.
- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN.** Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell.* 1998;93:385-395.
- Park CK, Nehls DG, Graham DI, Teasdale GM, McCulloch J.** The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 1988;24:543-551.
- Park CK, McCulloch J, Kang JK, Choi CR.** Pretreatment with a competitive NMDA antagonist D-CPPene attenuates focal cerebral infarction and brain swelling in awake rats. *Acta Neurochir.* 1994;127:220-226.

- Parra O, Arboix A, Bechich S, Garcia-Eroles L, Montserrat JM, Lopez JA, Ballester E, Guerra JM, Sopena JJ.** Time course of sleep-related breathing disorders in first-ever stroke or transient ischemic attack. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:375-380.
- Parsons MW, Barber PA, Chalk J, Darby DG, Rose S, Desmond PM, Gerraty RP, Tress BM, Wright PM, Donnan GA, Davis SM.** Diffusion- and perfusion-weighted MRI response to thrombolysis in stroke. *Ann Neurol.* 2002;51:28-37.
- Peeling J, Corbett D, Del Bigio MR, Hudzik T, Campbell TM, Palmer GC.** Rat middle cerebral artery occlusion: correlations between histopathology, T2-weighted magnetic resonance imaging, and behavioral indices, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2001;10:166-177.
- Pelidou SH, Kostulas N, Matusевич D, Kivisakk P, Kostulas V, Link H.** High levels of IL-10 secreting cells are present in blood in cerebrovascular diseases. *Eur J Neurol.* 1999;6:437-442.
- Pena VS, Miravittles M, Gabriel R, Jimenez-Ruiz CA, Villasante C, Masa JF, Viejo JL, Fernandez-Fau L.** Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest.* 2000; 118:981-989.
- Penar PL, Greer CA.** The effect of intravenous tissue-type plasminogen activator in a rat model of embolic cerebral ischemia. *Yale J Biol Med.* 1987;60:233-243.
- Peng UJ, Kline DD, Dick TE, Prabhakar NR.** Chronic intermittent hypoxia enhances carotid body chemoreceptor response to low oxygen. In: *Frontiers in modeling and control of breathing: Integration at molecular, cellular and systems levels.* Poon CS and Kazemi H, Eds. New York: Kluwer Academic. 2002.
- Peng YJ, Overholt JL, Kline D, Kumar GK, Prabhakar NR.** Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:10073-10078.
- Peng ZC, Pietra C, Sbarbati A, Ziviani L, Yan XB, Osculati F, Bentivoglio M.** Induction of NADPH-diaphorase activity in the rat forebrain after middle cerebral artery occlusion. *Exp Neurol.* 1996;138:105-120.
- Pennington BF, Smith SD, Kimberling WJ, Green PA, Haith MM.** Left-handedness and immune disorders in familial dyslexics. *Arch Neurol.* 1987;44:634-639.

- Perez-Pinzon MA, Xu GP, Mumford PL, Dietrich WD, Rosenthal M, Sick TJ.** Rapid ischemic preconditioning protects rats from cerebral anoxia/ischemia. *Adv Exp Med Biol.* 1997;428:155-161.
- Perini F, Morra M, Alecci M, Galloni E, Marchi M, Toso V.** Temporal profile of serum anti-inflammatory and pro-inflammatory interleukins in acute ischemic stroke patients. *Neurol Sci.* 2001;22:289-296
- Perry VH.** The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun.* 2004;18:407-413.
- Pert CB, Ruff MR, Weber RJ, Herkenham M.** Neuropeptides and their receptors: a psychosomatic network. *J Immunol.* 1985;135:S820-S826.
- Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F.** Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology.* 1987;37:1281-1286.
- Phillips JB, Williams AJ, Adams J, Elliott PJ, Tortella FC.** Proteasome inhibitor PS519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2000;31:1686-1693.
- Philo JS, Aoki KH, Arakawa T, Narhi LO, Wen J.** Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: one high-affinity and one low-affinity interaction. *Biochemistry.* 1996;35:1681-1691.
- Piantadosi CA, Zhang J.** Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. *Stroke.* 1996;27:327-331.
- Piette J, Piret B, Bonizzi G, Schoonbroodt S, Merville MP, Legrand-Poels S, Bours V.** Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation. *Biol Chem.* 1997;378:1237-1245.
- Pin JP, Duvoisin R.** The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology.* 1995;34:1-26.
- Plywaczewski R, Sliwinski P, Nowinski A, Kaminski D, Zielinski J.** Incidence of nocturnal desaturation while breathing oxygen in COPD patients undergoing long-term oxygen therapy. *Chest.* 2000;117:679-683.
- Pozzilli C, Lenzi GL, Argentino C, Bozzao L, Rasura M, Giubilei F, Fieschi C.** Peripheral white blood cell count in cerebral ischemic infarction. *Acta Neurol Scand.* 1985;71:396-400.

- Prabhakar NR.** Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J Appl Physiol.* 2001;90:1986-1994.
- Prabhakar NR.** Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors. *J Appl Physiol.* 2000;88:2287-2295.
- Prabhakar NR.** Sleep apneas: an oxidative stress? *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165:859-860.
- Prass K, Meisel C, Hoflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A.** Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med.* 2003a;198:725-736.
- Prass K, Scharff A, Ruscher K, Lowl D, Muselmann C, Victorov I, Kapinya K, Dirnagl U, Meisel A.** Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke.* 2003b;34:1981-1986.
- Prass K, Wiegand F, Schumann P, Ahrens M, Kapinya K, Harms C, Liao W, Trendelenburg G, Gertz K, Moskowitz MA, Knapp F, Victorov IV, Megow D, Dirnagl U.** Hyperbaric oxygenation induced tolerance against focal cerebral ischemia in mice is strain dependent. *Brain Res.* 2000;871:146-150.
- Premkumar DR, Adhikary G, Overholt JL, Simonson MS, Cherniack NS, Prabhakar NR.** Intracellular pathways linking hypoxia to activation of c-fos and AP-1. *Adv Exp Med Biol.* 2000;475:101-109.
- Pugh CW, Tan CC, Jones RW, Ratcliffe PJ.** Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:10553-10557.
- Pulsinelli WA, Brierley JB.** A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke.* 1979;10:267-272.
- Pulsinelli WA, Buchan AM.** The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke.* 1988;19:913-914.
- Pulsinelli WA, Jacewicz M.** Animal models of brain ischemia, In: *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, 2nd ed. Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM and Xatsu FM, Eds. Churchill Livingstone, New York. 1992; pp:49-67.

- Pulsinelli WA, Levy DE, Sigsbee B, Scherer P, Plum F.** Increased damage after ischemic stroke in patients with hyperglycemia with or without established diabetes mellitus. *Am J Med.* 1983;74:540-544.
- Qiu H, Belanger A, Yoon HW, Bunn HF.** Homodimerization restores biological activity to an inactive erythropoietin mutant. *J Biol Chem.* 1998;273:11173-11176.
- Quelle FW, Wang D, Nosaka T, Thierfelder WE, Stravopodis D, Weinstein Y, Ihle JN.** Erythropoietin induces activation of Stat5 through association with specific tyrosines on the receptor that are not required for a mitogenic response. *Mol Cell Biol.* 1996;16:1622-1631.
- Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L.** Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol.* 1979;236:H818-H827.
- Rao SV, Stamler JS.** Erythropoietin, anemia, and orthostatic hypotension: the evidence mounts. *Clin Auton Res.* 2002;12:141-143.
- Ratcliffe PJ.** Molecular biology of erythropoietin. *Kidney Int.* 1993;44:887-904.
- Ratcliffe PJ, Ebert BL, Firth JD, Gleadle JM, Maxwell PH, Nagao M, O'Rourke JF, Pugh CW, Wood SM.** Oxygen regulated gene expression: erythropoietin as a model system. *Kidney Int.* 1997;51:514-526.
- Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A.** Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev.* 2000;14:34-44.
- Read SJ, Hirano T, Davis SM, Donnan GA.** Limiting neurological damage after stroke: a review of pharmacological treatment options. *Drugs Aging.* 1999;14:11-39.
- Reineck LA, Agarwal S, Hillis AE.** "Diffusion-clinical mismatch" is associated with potential for early recovery of aphasia. *Neurology.* 2005;64:828-833.
- Reis DJ, Golanov EV, Ruggiero DA, Sun MK.** Sympatho-excitatory neurons of the rostral ventrolateral medulla are oxygen sensors and essential elements in the tonic and reflex control of the systemic and cerebral circulations. *J Hypertens.* 1994;12:S159-S180.
- Reitan JA, Kien ND, Thorup S, Corkill G.** Hyperbaric oxygen increases survival following carotid ligation in gerbils. *Stroke.* 1990;21:119-123.

- Relton JK, Martin D, Thompson RC, Russell DA.** Peripheral administration of Interleukin-1 Receptor antagonist inhibits brain damage after focal cerebral ischemia in the rat. *Exp Neurol.* 1996;138:206-213.
- Relton JK, Rothwell NJ.** Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull.* 1992;29:243-246.
- Remy I, Wilson IA, Michnick SW.** Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science.* 1999;283:990-993.
- Renoux G.** The cortex regulates the immune system and the activities of a T-cell specific immunopotentiator. *Int J Neurosci.* 1988;39:177-187.
- Renoux G, Biziere K, Renoux M, Bardos P, Degenne D.** Consequences of bilateral brain neocortical ablation on imuthiol-induced immunostimulation in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;496:346-353.
- Renoux G, Biziere K, Renoux M, Guillaumin JM.** The cerebral cortex regulates immune responses in the mouse. *C R Seances Acad Sci D.* 1980;290:719-722
- Renoux G, Biziere K, Renoux M, Guillaumin JM.** The production of T-cell-inducing factors in mice is controlled by the brain neocortex. *Scand J Immunol.* 1983b;17:45-50.
- Renoux G, Biziere K, Renoux M, Guillaumin JM, Degenne D.** A balanced brain asymmetry modulates T cell-mediated events. *J Neuroimmunol.* 1983a;5:227-238.
- Renoux G, Renoux M.** Immunopotential and anabolism induced by sodium diethyldithiocarbamate. *J Immunopharmacol.* 1979;1:247-267.
- Renoux G, Renoux M, Biziere K, Guillaumin JM, Bardos P, Degenne D.** Involvement of brain neocortex and liver in the regulation of T cells: the mode of action of sodium diethyldithiocarbamate (imuthiol). *Immunopharmacology.* 1984;7:89-100.
- Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J.** p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem.* 1999;274:32631-3267.
- Richter C.** Pro-oxidants and mitochondrial Ca²⁺: their relationship to apoptosis and oncogenesis. *FEBS Lett.* 1993;325:104-107.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH.** Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997;20:570-577.

- Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, Miletich JP, Malinow MR, Stampfer MJ.** Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation*. 1997;95:1777-1782.
- Ringelstein EB, Biniek R, Weiller C, Ammeling B, Nolte PN, Thron A.** Type and extent of hemispheric brain infarctions and clinical outcome in early and delayed middle cerebral artery recanalization. *Neurology*. 1992;42:289-298.
- Rivier C, Chizzonite R, Vale W.** In the mouse, the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by a lipopolysaccharide (endotoxin) is mediated through interleukin-1. *Endocrinology*. 1989a;125:2800-2805.
- Rivier C, Vale W, Brown M.** In the rat, interleukin-1 alpha and -beta stimulate adrenocorticotropin and catecholamine release. *Endocrinology*. 1989b;125:3096-3102.
- Roberts E.** Gamma-aminobutyric acid and nervous system function--a perspective. *Biochem Pharmacol*. 1974;23:2637-2649.
- Robinson MJ, Macrae IM, Todd M, Reid JL, McCulloch J.** Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the rat. *Neurosci Lett*. 1990;118:269-272.
- Robinson TG, James M, Youde J, Panerai R, Potter J.** Cardiac baroreceptor sensitivity is impaired after acute stroke. *Stroke*. 1997;28:1671-1676.
- Robinson TG, Potter J, Panerai R.** Heart rate variability following ischemic stroke. *Stroke*. 1999;30:2246-2247.
- Roffe C.** Hypoxaemia and stroke. *Rev Clin Gerontol*. 2001;11:323-335.
- Roffe C, Sills S.** Hypoxia in patients with acute stroke. *Age Ageing*. 2000; 29:60.
- Roffe C, Sills S, Halim M, Wilde K, Allen MB, Jones PW, Crome P.** Unexpected nocturnal hypoxia in patients with acute stroke. *Stroke*. 2003; 34:2641-2645.
- Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB.** Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*. 1997;28:2060-2065;
- Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH.** Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem*. 1997;272:20055-20062.
- Ronning OM, Guldvog B.** Should stroke victims routinely receive supplemental oxygen? A quasi-randomized controlled trial. *Stroke*. 1999;30:2033-2037.

- Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G.** Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:360-366.
- Rosenthal RE, Silbergleit R, Hof PR, Haywood Y, Fiskum G.** Hyperbaric oxygen reduces neuronal death and improves neurological outcome after canine cardiac arrest. *Stroke.* 2003;34:1311-1316.
- Roszman TL, Brooks WH.** Neural modulation of immune function. *J Neuroimmunol.* 1985;10:59-69.
- Roszman TL, Cross RL, Brooks WH, Markesbery WR.** Neuroimmunomodulation. Effects of neural lesions on cellular immunity. In: *Neural Modulation of Immunity.* Guillemin R and Melnechuck T, Eds. Raven Press. New York. 1985b; p:95-109.
- Roszman TL, Jackson JC, Cross RJ, Titus MJ, Markesbery WR, Brooks WH.** Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function. *J Immunol.* 1985a;135:S769-S772.
- Rothman S.** Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci.* 1984;4:1884-1891.
- Rothwell NJ.** Annual review prize lecture cytokines - killers in the brain? *J Physiol.* 1999;514:3-17.
- Rowat A, Wardlaw J, Dennis M, McDowell M, Charlmers C, Signorini D.** How does altering the position of stroke patients affect their arterial oxygen saturation and blood pressure? *Cerebrovasc Disord.* 1998;8:29.
- Rowell LB, Johnson DG, Chase PB, Comess KA, Seals DR.** Hypoxemia raises muscle sympathetic activity but not norepinephrine in resting humans. *J Appl Physiol.* 1989; 66:1736-1743.
- Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, Meisel A.** Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci.* 2002;22:10291-10301.
- Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, Weih M, Iurato L, Meisel A, Dirnagl U.** Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett.* 1998;254:117-120.

- Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, de Wit C, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rulicke T, Shaw S, Lindberg RL, Rodenwaldt B, Lutz H, Bauer C, Luscher TF, Gassmann M.** Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:11609-11613.
- Russell MO, Goldberg HI, Hodson A, Kim HC, Halus J, Reivich M, Schwartz E.** Effect of transfusion therapy on arteriographic abnormalities and on recurrence of stroke in sickle cell disease. *Blood.* 1984;63:162-169.
- Ryan HE, Lo J, Johnson RS.** HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* 1998;17:3005-30015.
- Sacco RL, Benjamin EJ, Broderick JP, Dyken M, Easton JD, Feinberg WM, Goldstein LB, Gorelick PB, Howard G, Kittner SJ, Manolio TA, Whisnant JP, Wolf PA.** American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. *Stroke.* 1997;28:1507-1517.
- Sacco RL, Boden-Albala B, Gan R, Chen X, Kargman DE, Shea S, Paik MC, Hauser WA.** Stroke incidence among white, black, and Hispanic residents of an urban community: the Northern Manhattan Stroke Study. *Am J Epidemiol.* 1998;147:259-268.
- Sacco RL, Elkind M, Boden-Albala B, Lin IF, Kargman DE, Hauser WA, Shea S, Paik MC.** The protective effect of moderate alcohol consumption on ischemic stroke. *JAMA.* 1999;281:53-60.
- Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R.** Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253:26-32.
- Safirstein R, Price PM, Saggi SJ, Harris RC.** Changes in gene expression after temporary renal ischemia. *Kidney Int.* 1990;37:1515-1521.
- Saint-Marseille A, Kouassi E, D'Angelo, G, Laplante P, Chheng S, Trouvé ML, Gilbert F, Geadah D, Braun CMJ.** Opposed left and right neocortical involvement in the immune response indexed by cerebrovascular accidents in humans. TENNET VII: Theoretical and experimental neuropsychology. Montreal, Quebec, Canada, August 14-16, 1996, Proceedings and abstracts. *Brain Cogn.* 1996;32:173-175.

- Sairanen T, Carpen O, Karjalainen-Lindsberg ML, Paetau A, Turpeinen U, Kaste M, Lindsberg PJ.** Evolution of cerebral tumor necrosis factor-alpha production during human ischemic stroke. *Stroke*. 2001;32:1750-1758.
- Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R.** In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:4635-4640.
- Salford LG, Plum F, Brierley JB.** Graded hypoxia-oligemia in rat brain. II. Neuropathological alterations and their implications. *Arch Neurol*. 1973;29:234-238.
- Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL.** Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke*. 1997;28:1283-1288.
- Sandberg O, Franklin KA, Bucht G, Gustafson Y.** Sleep apnea, delirium, depressed mood, cognition, and ADL ability after stroke. *J Am Geriatr Soc*. 2001;49:391-397.
- Sandner P, Wolf K, Bergmaier U, Gess B, Kurtz A.** Hypoxia and cobalt stimulate vascular endothelial growth factor receptor gene expression in rats. *Pflugers Arch*. 1997;433:803-808.
- Sarlis NJ, Chowdrey HS, Stephanou A, Lightman SL.** Chronic activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and loss of circadian rhythm during adjuvant-induced arthritis in the rat. *Endocrinology*. 1992;130:1775-1779.
- Sasaki R, Masuda S, Nagao M.** Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000;64:1775-1793.
- Sasaki R, Masuda S, Nagao M.** Pleiotropic functions and tissue-specific expression of erythropoietin. *News Physiol Sci*. 2001;16:110-113.
- Satz P, Soper HV.** Left-handedness, dyslexia, and autoimmune disorder: a critique. *J Clin Exp Neuropsychol*. 1986;8:453-458.
- Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C.** Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*. 1993;14:131-136.
- Sawada K, Krantz SB, Dai CH, Koury ST, Horn ST, Glick AD, Civin CI.** Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J Cell Physiol*. 1990;142:219-230.
- Sawyer ST, Penta K.** Association of JAK2 and STAT5 with erythropoietin receptors. Role of receptor phosphorylation in erythropoietin signal transduction. *J Biol Chem*. 1996;271:32430-32437.

- Schiffer D, Giordana MT, Migheli A, Giaccone G, Pezzotta S, Mauro A.** Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res.* 1986;374:110-118.
- Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA.** Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood.* 1990;75:40-47.
- Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt JF.** Expression of c-fos and c-jun during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology.* 1996;23:1546-1555.
- Schmidley JW.** Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke.* 1990;21:1086-1090.
- Schooley JC, Mahlmann LJ.** Adenosine, AMP, cyclic AMP, theophylline and the action and production of erythropoietin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1975;150:215-219.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA.** Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991;10:2247-2258.
- Schroeter M, Jander S, Huitinga I, Stoll G.** CD8+ phagocytes in focal ischemia of the rat brain: predominant origin from hematogenous macrophages and targeting to areas of pannecrosis. *Acta Neuropathol.* 2001;101:440-448.
- Schroeter M, Jander S, Huitinga I, Witte OW, Stoll G.** Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. *Stroke.* 1997;28:382-386.
- Schroeter M, Jander S, Witte OW, Stoll G.** Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *J Neuroimmunol.* 1994;55:195-203.
- Schroeter M, Jander S, Witte OW, Stoll G.** Heterogeneity of the microglial response in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Neuroscience.* 1999;89:1367-1377.
- Schroeter M, Schiene K, Kraemer M, Hagemann G, Weigel H, Eysel UT, Witte OW, Stoll G.** Astroglial responses in photochemically induced focal ischemia of the rat cortex. *Exp Brain Res.* 1995;106:1-6.

- Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W.** Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem.* 1992;267:5317-5323.
- Schumacker PT.** Current paradigms in cellular oxygen sensing. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 543:57-71.
- Schwab S, Spranger M, Aschoff A, Steiner T, Hacke W.** Brain temperature monitoring and modulation in patients with severe MCA infarction. *Neurology.* 1997;48:762-767.
- Schwartz RD, Yu X.** Inhibition of GABA-gated chloride channel function by arachidonic acid. *Brain Res.* 1992;585:405-410.
- Scott LV, Dinan TG.** Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci.* 1998;62:1985-1998.
- Searleman A, Fugagli AK.** Suspected autoimmune disorders and left-handedness: evidence from individuals with diabetes. Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neuropsychologia.* 1987;25:367-374.
- Seferynska I, Brookins J, Rice JC, Fisher JW.** Erythropoietin production in exhypoxic polycythemic mice. *Am J Physiol.* 1989;256:C925-C929.
- Seil FJ.** Recovery and repair issues after stroke from the scientific perspective. *Curr Opin Neurol.* 1997;10:49-51.
- Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF.** Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1990;144:129-135.
- Semenza GL.** Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1994;8:863-884.
- Semenza GL.** Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:551-578.
- Semenza GL.** HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol.* 2000a;88:1474-1480.
- Semenza GL.** Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest.* 2000b;106:809-812.

- Semenza GL.** HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell.* 2001;107:1-3.
- Semenza GL, Neifelt MK, Chi SM, Antonarakis SE.** Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:5680-5684.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL.** Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1994;269:23757-23763.
- Semenza GL, Wang GL.** A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992;12:5447-5454.
- Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP, Klann E.** NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res.* 2003;988:193-198.
- Shahar E, Whitney CW, Redline S, Lee ET, Newman AB, Javier Nieto F, O'Connor GT, Boland LL, Schwartz JE, Samet JM.** Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:19-25.
- Sharkey J, Butcher SP.** Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. *J Neurosci Methods.* 1995;60:125-131.
- Sharkey J, Ritchie IM, Kelly PA.** Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993;13:865-871.
- Sharp FR, Bergeron M, Bernaudin M.** Hypoxia-inducible factor in brain. *Adv Exp Med Biol.* 2001;502:273-291.
- Sherman DG.** Ancrod. *Curr Med Res Opin.* 2002;18:S48-S52.
- Sherman DG, Dyken ML Jr, Gent M, Harrison JG, Hart RG, Mohr JP.** Antithrombotic therapy for cerebrovascular disorders. An update. *Chest.* 1995;108:S444-456.
- Shimada N, Graf R, Rosner G, Wakayama A, George CP, Heiss WD.** Ischemic flow threshold for extracellular glutamate increase in cat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989;9:603-606.

- Shimizu S, Enoki Y, Sakata S, Kohzuki H, Ohga Y, Matsumura K.** Erythropoietin response to acute hypobaric or anaemic hypoxia in gentamicin-administered rats. *Acta Physiol Scand.* 1994;151:225-231.
- Shreeniwas R, Koga S, Karakurum M, Pinsky D, Kaiser E, Brett J, Wolitzky BA, Norton C, Plocinski J, Benjamin W.** Hypoxia-mediated induction of endothelial cell interleukin-1 alpha. An autocrine mechanism promoting expression of leukocyte adhesion molecules on the vessel surface. *J Clin Invest.* 1992;90:2333-2339.
- Shuaib A.** Management of acute stroke. Shuaib A and Goldstein LB, Eds. New York: Marcel Dekker, Inc. 1999: pp-1-14.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E.** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359:843-845.
- Sieff Ca, Nathan DG.** Haemopoietic stem cells. In : *Oxford Textbook of Medicine* (3e éd.). Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warren DA, Eds. Oxford, UK: Oxford University Press. 1996; pp:3381-3390.
- Siesjo BK.** Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;522:638-661.
- Siesjo BK.** Calcium in the brain under physiological and pathological conditions. *Eur Neurol.* 1990;30:SII3-SII9.
- Siesjo BK.** Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg.* 1992a;77:169-184.
- Siesjo BK.** Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg.* 1992b;77:337-354.
- Siesjo BK, Bengtsson F.** Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989;9:127-140.
- Silva Y, Serena K, Osuna T, Castellanos M, Suner R, Davalos A.** Hypoxaemia as an early predictor of progressing stroke and poor outcome in the acute phase. *Cerebrovascular Dis.* 2001;11:70.
- Silverstein A.** Thrombotic thrombocytopenic purpura. The initial neurologic manifestations. *Arch Neurol.* 1968;18:358-362.

- Silvestrini M, Pietroiusti A, Troisi E, Franceschelli L, Piccolo P, Magrini A, Bernardi G, Galante A.** Leukocyte count and aggregation during the evolution of cerebral ischemic injury. *Cerebrovasc Dis.* 1998;8:305-309.
- Siman R, Noszek JC.** Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron.* 1988;1:279-287.
- Simms HH, D'Amico R.** Regulation of whole blood polymorphonuclear leukocyte phagocytosis following hypoxemia and hypoxemia/reoxygenation. *Shock.* 1994;1:10-18.
- Simms HH, D'Amico R.** Regulation of polymorphonuclear leukocyte cytokine receptor expression: the role of altered oxygen tensions and matrix proteins. *J Immunol.* 1996;157:3605-3616.
- Simon RP.** Hypoxia versus ischemia. *Neurology.* 1999;52:7-8.
- Sinor AD, Greenberg DA.** Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity. *Neurosci Lett.* 2000;290:213-215.
- Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P.** Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001b;98:4044-4049.
- Sirén AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H.** Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta. Neuropathol.* 2001a;101: 271–276.
- Slivka A, Brannan TS, Weinberger J, Knott PJ, Cohen G.** Increase in extracellular dopamine in the striatum during cerebral ischemia: a study utilizing cerebral microdialysis. *J Neurochem.* 1988;50:1714-1718.
- Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, del Zoppo GJ, Hallenbeck JM, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Tyrrell PJ.** Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol.* 2004;4:2-9.
- Smith GM, Hale JH.** Macrophage/Microglia regulation of astrocytic tenascin: synergistic action of transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor. *J Neurosci.* 1997;17:9624-9633.

- Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjo BK.** Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand.* 1984;69:385-401.
- Snowden DA.** Healthy aging and dementia: findings from the Nun study. *Ann Intern Med.* 2003;139:450-454.
- Snowden DA, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA, Markesbery WR.** Brain infarction and clinical expression of Alzheimer's disease. The Nun study. *JAMA.* 1997;277:813-817.
- Socolovsky M, Dusanter-Fourt I, Lodish HF.** The prolactin receptor and severely truncated erythropoietin receptors support differentiation of erythroid progenitors. *J Biol Chem.* 1997;272:14009-14012.
- Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF.** Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell.* 1999;98:181-191.
- Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Ema M, Abe M, Abe H, Fujii-Kuriyama Y.** Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:7368-7373.
- Soriano JB, Maier WC, Egger P, Visick G, Thakrar B, Sykes J, Pride NB.** Recent trends in physician diagnosed COPD in women and men in the UK. *Thorax.* 2000;55:789-794.
- Springborg JB, Sonne B, Frederiksen HJ, Foldager N, Poulsgaard L, Klausen T, Jorgensen OS, Olsen NV.** Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage originates from the brain. *Brain Res.* 2003;984:143-148.
- Stagliano NE, Perez-Pinzon MA, Moskowitz MA, Huang PL.** Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:757-761.
- Stanimirovic D, Satoh K.** Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol.* 2000;10:113-126.
- Staub F, Winkler A, Peters J, Kempfski O, Kachel V, Baethmann A.** Swelling, acidosis, and irreversible damage of glial cells from exposure to arachidonic acid in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:1030-1039.

- Studel W, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Weimann J, Huang PL, Jones RC, Picard MH, Zapol WM.** Sustained pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy after chronic hypoxia in mice with congenital deficiency of nitric oxide synthase 3. *J Clin Invest.* 1998;101:2468-2477.
- Steiner DR, Gonzalez NC, Wood JG.** Leukotriene B(4) promotes reactive oxidant generation and leukocyte adherence during acute hypoxia. *J Appl Physiol.* 2001;91:1160-1167.
- Stevens SL, Bao J, Hollis J, Lessov NS, Clark WM, Stenzel-Poore MP.** The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* 2002;932:110-119.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M.** Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol.* 2002;513:87-113.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M.** Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol.* 1998;56:149-171.
- Straub RH, Westermann J, Scholmerich J, Falk W.** Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. *Immunol Today.* 1998;19:409-413.
- Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR).** Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke.* 1999;30:2752-2758.
- Sulter G, Elting JW, Stewart R, den Arend A, De Keyser J.** Continuous pulse oximetry in acute hemiparetic stroke. *J Neurol Sci.* 2000;179:65-69.
- Sunami K, Takeda Y, Hashimoto M, Hirakawa M.** Hyperbaric oxygen reduces infarct volume in rats by increasing oxygen supply to the ischemic periphery. *Crit Care Med.* 2000;28:2831-2836.
- Sunderland MC, Roodman GD.** Interleukin-3. Its biology and potential uses in pediatric hematology/oncology. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1991;13:414-425.
- Sutherland GR, Dix GA, Auer RN.** Effect of age in rodent models of focal and forebrain ischemia. *Stroke.* 1996;27:1663-1667
- Sutherland GR, Peeling J, Sutherland E, Tyson R, Dai F, Kozlowski P, Saunders JK.** Forebrain ischemia in diabetic and nondiabetic BB rats studied with ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Diabetes.* 1992;41:1328-1334.

- Suzuki J, Yoshimoto T, Tnanka S, Sakamoto T.** Production of various models of cerebral infarction in the dog by means of occlusion of intracranial trunk arteries. *Stroke*.1980;11:337-341.
- Sydserff SG, Cross AJ, Green AR.** The neuroprotective effect of chlormethiazole on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery ischaemia in the rat. *Neurodegeneration*. 1995b;4:323-328.
- Sydserff SG, Cross AJ, West KJ, Green AR.** The effect of chlormethiazole on neuronal damage in a model of transient focal ischaemia. *Br J Pharmacol*. 1995a;114:1631-1635.
- Sydserff SG, Green AR, Cross AJ.** The effect of oedema and tissue swelling on the measurement of neuroprotection; a study using chlormethiazole and permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurodegeneration*. 1996;5:81-85.
- Syrjanen J, Teppo AM, Valtonen VV, Iivanainen M, Maury CP.** Acute phase response in cerebral infarction. *J Clin Pathol*. 1989;42:63-68.
- Swanson LW (Ed.).** *Brain Maps: Structure of the rat brain*. 2nd edition. Elsevier, Amsterdam. 1998; pp: 267
- Sze PC, Reitman D, Pincus MM, Sacks HS, Chalmers TC.** Antiplatelet agents in the secondary prevention of stroke: meta-analysis of the randomized control trials. *Stroke*. 1988;19:436-442.
- Tabakman R, Lecht S, Sephanova S, Arien-Zakay H, Lazarovici P.** Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury. *Prog Brain Res*. 2004;146:387-401.
- Tabira T, Konishi Y, Gallyas F Jr.** Neurotrophic effect of hematopoietic cytokines on cholinergic and other neurons in vitro. *Int J Dev Neurosci*. 1995;13:241-252.
- Taher MM, Oakley JD, Hershey C, Valerie K.** Activation of NF-kappa B and p38 MAP kinase is not sufficient for triggering efficient HIV gene expression in response to stress. *Biochemistry*. 2000;39:1709-1715.
- Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, Yuki H, Kato S, Tomoike H.** The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1179-1184.

- Takeshima R, Kirsch JR, Koehler RC, Gomoll AW, Traystman RJ.** Monoclonal leukocyte antibody does not decrease the injury of transient focal cerebral ischemia in cats. *Stroke*. 1992;23:247-252.
- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM.** Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1981;1:53-60.
- Tamura K, Sudo T, Senftleben U, Dadak AM, Johnson R, Karin M.** Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell*. 2000;102:221-231.
- Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ.** Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol*. 1992;263:F474-F481.
- Tan CC, Eckardt KU, Ratcliffe PJ.** Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int*. 1991;40:69-76.
- Tarkowski E, Blomstrand C, Tarkowski A.** Stroke induced lateralization of delayed-type hypersensitivity in the early and chronic phase of the disease: a prospective study. *J Clin Lab Immunol*. 1995b;46:73-83.
- Tarkowski E, Ekelund P, Tarkowski A.** Enhancement of antigen-specific T-cell reactivity on the affected side in stroke patients. *J Neuroimmunol*. 1991;34:61-67.
- Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelso C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A.** Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke*. 1995a;26:1393-1398.
- Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelso C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A.** Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke. *Clin Exp Immunol*. 1997;110:492-499.
- Taylor IW, Hodson PJ.** Cell cycle regulation by environmental pH. *J Cell Physiol*. 1984;121:517-525.
- Taylor TN, Davis PH, Torner JC, Holmes J, Meyer JW, Jacobson MF.** Lifetime cost of stroke in the United States. *Stroke*. 1996;27:1459-1466.
- Tedgui A, Mallat Z.** Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res*. 2001;88:877-887.

- Terai K, Matsuo A, McGeer EG, McGeer PL.** Enhancement of immunoreactivity for NF-kappa B in human cerebral infarctions. *Brain Res.* 1996;739:343-349.
- The National Stroke Association. The Stroke/Brain Attack Reporter's Handbook.** The National Stroke Association, Eds. 2nd Edition. 1997; pp:1-9
- The Antiphospholipid antibodies in stroke study (APASS) group.** Anticardiolipin antibodies are an independent risk factor for first ischemic stroke. *Neurology.* 1993;43:2069-2073.
- The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators.** Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet.* 2000;355:253-259.
- The International stroke trial collaborative group : The international stroke trial (IST).** A randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischemic stroke. *Lancet.* 1997;349:1569-1581.
- The MRC European Carotid Surgery Trial (ECST).** Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet.* 1998;351:1379-1387.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group.** Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333:1581-1587.
- The Publications Committee for the Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Investigators.** Low molecular weight heparinoid, ORG 10172 (danaparoid), and outcome after acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *JAMA.* 1998;279:1265-1272.
- The Stroke Prevention in Atrial Fibrillation III randomised clinical trial Investigators.** Adjusted-dose warfarin versus low-intensity, fixed-dose warfarin plus aspirin for high-risk patients with atrial fibrillation. *Lancet.* 1996;348:633-638.
- Tirilazad International Steering Committee.** Tirilazad mesylate in acute ischemic stroke: A systematic review. *Stroke.* 2000;31:2257-2265.
- Thomas DJ.** Whole blood viscosity and cerebral blood flow. *Stroke.* 1982;13:285-287.
- Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW.** Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood.* 1994;83:113-118.

- Todd MM, Drummond JC.** A comparison of the cerebrovascular and metabolic effects of halothane and isoflurane in the cat. *Anesthesiology*. 1984;60:276–282.
- Tohgi H, Yamanouchi H, Murakami M, Kameyama M.** Importance of the hematocrit as a risk factor in cerebral infarction. *Stroke*. 1978;9:369-374.
- Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, Kinoshita A, Ikemoto A, Nakamura S, Kimura J.** Glial expression of cytokines in the brains of cerebrovascular disease patients. *Acta Neuropathol*. 1996;92:281-287.
- Toyoda T, Kassell NF, Lee KS.** Induction of ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia. *Neuroreport*. 1997;8:847-851.
- Toyoda T, Suzuki S, Kassell NF, Lee KS.** Intraischemic hypothermia attenuates neutrophil infiltration in the rat neocortex after focal ischemia-reperfusion injury. *Neurosurgery*. 1996;39:1200-1205.
- Traystman RJ.** Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J*. 2003;44:85-95.
- Treib J, Grauer MT, Woessner R, Morgenthaler M.** Treatment of stroke on an intensive stroke unit: a novel concept. *Intensive Care Med*. 2000;26:1598–1611.
- Tsujimoto Y.** Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Biosci Rep*. 2002;22:47-58.
- Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF.** Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest*. 1995;95:1798-1807.
- Tunick PA, Kronzon I.** Protruding atherosclerotic plaque in the aortic arch of patients with systemic embolization: a new finding seen by transesophageal echocardiography. *Am Heart J*. 1990;120:658-660.
- Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL.** Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 1985;237:408-414.
- Ueda H, Fujita R.** Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. *Biol Pharm Bull*. 2004;27:950-955.
- Uematsu D, Araki N, Greenberg JH, Sladky J, Reivich M.** Combined therapy with MK-801 and nimodipine for protection of ischemic brain damage. *Neurology*. 1991 Jan;41(1):88-94.

- Ueno M, Brookins J, Beckman B, Fisher JW.** A1 and A2 adenosine receptor regulation of erythropoietin production. *Life Sci.* 1988;43:229-237.
- Ulich TR, Yin S, Guo K, Yi ES, Remick D, del Castillo J.** Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. *Am J Pathol.* 1991;138:1097-1101.
- Urban L, Neill KH, Crain BJ, Nadler JV, Somjen GG.** Postischemic synaptic excitation and N-methyl-D-aspartate receptor activation in gerbils. *Stroke.* 1990;21:III23-III27.
- Van Beek J, Chan P, Bernaudin M, Petit E, MacKenzie ET, Fontaine M.** Glial responses, clusterin, and complement in permanent focal cerebral ischemia in the mouse. *Glia.* 2000;31:39-50.
- Van Dam AM, Bauer J, Man-A-Hing WK, Marquette C, Tilders FJ, Berkenbosch F.** Appearance of inducible nitric oxide synthase in the rat central nervous system after rabies virus infection and during experimental allergic encephalomyelitis but not after peripheral administration of endotoxin. *J Neurosci Res.* 1995;40:251-260.
- van de Bor M, Meinesz J, Benders MJ, Steendijk P, Lopes Cardozo RH, van Bel F.** Electrocardiac brain activity during hypoxia and hypotension in anesthetized newborn lambs. *Early Hum Dev.* 1999;55:237-245.
- van Dijk EJ, Vermeer SE, de Groot JC, van de Minkelis J, Prins ND, Oudkerk M, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM.** Arterial oxygen saturation, COPD, and cerebral small vessel disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004;75:733-736.
- van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Bootsma-van der Wiel A, Frolich M, Westendorp RG.** Inflammation and stroke: the Leiden 85-Plus Study. *Stroke.* 2002;33:1135-1138.
- van Strien JW, Bouma A, Bakker DJ.** Birth stress, autoimmune diseases, and handedness. *J Clin Exp Neuropsychol.* 1987;9:775-780.
- Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A.** Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke.* 2000a;31:2325-2329.
- Vila N, Filella X, Deulofeu R, Ascaso C, Abellana R, Chamorro A.** Cytokine-induced inflammation and long-term stroke functional outcome. *J Neurol Sci.* 1999;162:185-188.

- Vila N, Reverter JC, Yague J, Chamorro A.** Interaction between interleukin-6 and the natural anticoagulant system in acute stroke. *J Interferon Cytokine Res.* 2000b;20:325-329.
- Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P.** Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med.* 2003;198:971-975.
- Vingerhoets F, Bogousslavsky J.** Respiratory dysfunction in stroke. *Clin Chest Med.* 1994;15:729-737.
- Vinters HV.** Cerebral amyloid angiopathy. A critical review. *Stroke.* 1987;18:311-324.
- Vlajkovic S, Dugandzija-Novakovic S, Milanovic S, Jankovic BD.** Brain self-stimulation and immunity: effect on humoral and cell-mediated immune responses. *Int J Neurosci.* 1993;69:235-250.
- Voelkel NF, Tuder RM, Wade K, Hoper M, Lepley RA, Goulet JL, Koller BH, Fitzpatrick F.** Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) reduces pulmonary vascular reactivity and pulmonary hypertension in hypoxic rats. *J Clin Invest.* 1996;97:2491-2498.
- Wadia JS, Chalmers-Redman RM, Ju WJ, Carlile GW, Phillips JL, Fraser AD, Tatton WG.** Mitochondrial membrane potential and nuclear changes in apoptosis caused by serum and nerve growth factor withdrawal: time course and modification by (-)-deprenyl. *J Neurosci.* 1998;18:932-947.
- Walder CE, Green SP, Darbonne WC, Mathias J, Rae J, Dinauer MC, Curnutte JT, Thomas GR.** Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke.* 1997;28:2252-2258.
- Walczak H, Krammer PH.** The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res.* 2000;256:58-66.
- Walshaw MJ, Pearson MG.** Hypoxia in patients with acute hemiplegia. *Br Med J.* 1984; 288:15-17.
- Waltysson J, Hillered L, Andine P, Hagberg H, Persson L.** Neuropathological endpoints in experimental stroke pharmacotherapy: the importance of both early and late evaluation. *Acta Neurochir.* 1994;129:58-63.

- Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH, Walker M.** Smoking cessation and the risk of stroke in middle-aged men. *JAMA*. 1995;274:155-160.
- Wang D, Huang HJ, Kazlauskas A, Cavenee WK.** Induction of vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells by platelet-derived growth factor through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Res*. 1999;59:1464-1472.
- Wang GJ, Deng HY, Maier CM, Sun GH, Yenari MA.** Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/monocyte accumulation following experimental stroke. *Neuroscience*. 2002;114:1081-1090.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL.** Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:5510-5514.
- Wang GL, Semenza GL.** General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993a;90:4304-4308.
- Wang GL, Semenza GL.** Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*. 1993b;268:21513-21518.
- Wang GL, Semenza GL.** Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*. 1993c;82:3610-3615.
- Wang GL, Semenza GL.** Molecular basis of hypoxia-induced erythropoietin expression. *Curr Opin Hematol*. 1996;3:156-162.
- Wang J, Bankiewicz KS, Plunkett RJ, Oldfield EH.** Intrastriatal implantation of interleukin-1. Reduction of parkinsonism in rats by enhancing neuronal sprouting from residual dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the midbrain. *J Neurosurg*. 1994;80:484-490.
- Wang PY, Kao CH, Mui MY, Wang SJ.** Leukocyte infiltration in acute hemispheric ischemic stroke. *Stroke*. 1993;24:236-240.
- Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ.** Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol*. 1994;23:103-114.
- Wang X, Barone FC, Aiyar NV, Feuerstein GZ.** Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats. *Stroke*. 1997;28:155-161.

- Wang X, Feuerstein GZ.** Induced expression of adhesion molecules following focal brain ischemia. *J Neurotrauma*. 1995;12:825-832.
- Wang X, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ.** Demonstration of increased endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 mRNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke*. 1995b;26:1665-1668.
- Wang X, Yue TL, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ.** Expression of interleukin-6, c-fos, and zif268 mRNAs in rat ischemic cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995a;15:166-171.
- Wardlaw JM, Warlow CP, Counsell C.** Systematic review of evidence on thrombolytic therapy for acute ischaemic stroke. *Lancet*. 1997;350:607-614.
- Warlow CP, Dennis MS, vna Gijn J.** *Stroke: a practical guide to management*. Oxford: Blackwell Scientific, 1996.
- Warlow CP.** Epidemiology of stroke. *Lancet*. 1998 ;352:SI11-III4.
- Wassmann H, Marinov M, Moskopp D.** Effects of nimodipine in experimental permanent focal cerebral ischemia. *Zentralbl Neurochir*. 1992;53:141-147.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD.** Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*. 1985;17:497-504.
- Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT.** Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res*. 2001;88:1259-1266.
- Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM.** Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:125-63.
- Wechsler AS, Entwistle JC 3rd, Yeh T Jr, Ding M, Jakoi ER.** Early gene changes in myocardial ischemia. *Ann Thorac Surg*. 1994;58:1282-1284.
- Weigent DA, Blalock JE.** Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. *Immunol Rev*. 1987;100:79-108.
- Weih M, Bergk A, Isaev NK, Ruscher K, Megow D, Riepe M, Meisel A, Victorov IV, Dirnagl U, Dirnagi U.** Induction of ischemic tolerance in rat cortical neurons by 3-nitropropionic acid: chemical preconditioning. *Neurosci Lett*. 1999a;272:207-210.

- Weih M, Kallenberg K, Bergk A, Dirnagl U, Harms L, Wernecke KD, Einhaupl KM.** Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke*. 1999b;30:1851-1854.
- Weinberger B.** Principles of Pulmonary Medicine. 3rd edition. Saunders publishing. Chapter 1. 1998; pp:1-20.
- Weinberger J, Cohen G.** The differential effect of ischemia on the active uptake of dopamine, gamma-aminobutyric acid, and glutamate by brain synaptosomes. *J Neurochem*. 1982;38:963-968.
- Weinberger J, Cohen G, Nieves-Rosa J.** Nerve terminal damage in cerebral ischemia: greater susceptibility of catecholamine nerve terminals relative to serotonin nerve terminals. *Stroke*. 1983;14:986-989.
- Weinberger J, Nieves-Rosa J, Cohen G.** Nerve terminal damage in cerebral ischemia: protective effect of alpha-methyl-para-tyrosine. *Stroke*. 1985;16:864-870.
- Weinberger J, Nieves-Rosa J.** Monoamine neurotransmitters in the evolution of infarction in ischemic striatum: morphologic correlation. *J Neural Transm*. 1988;71:133-142.
- Weir CJ, Kaste M, Lees KR; Glycine Antagonist in Neuroprotection (GAIN) International Steering Committee and Investigators.** Targeting neuroprotection clinical trials to ischemic stroke patients with potential to benefit from therapy. *Stroke*. 2004;35:2111-2116.
- Weinstein PR, Anderson GG, Telles DA.** Results of hyperbaric oxygen therapy during temporary middle cerebral artery occlusion in unanesthetized cats. *Neurosurgery*. 1987;20:518-524.
- Welsh FA, Ginsberg MD, Rieder W, Budd WW.** Deleterious effect of glucose pretreatment on recovery from diffuse cerebral ischemia in the cat. II. Regional metabolite levels. *Stroke*. 1980;11:355-363.
- Welsh FA, Sims RE, Harris VA.** Mild hypothermia prevents ischemic injury in gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1990;10:557-563.
- Wenger RH, Gassmann M.** Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem*. 1997;378:609-616.
- Werns SW, Lucchesi BR.** Free radicals and ischemic tissue injury. *Trends Pharmacol Sci*. 1990;11:161-166.

- Wessendorf TE, Teschler H, Wang YM, Konietzko N, Thilmann AF.** Sleep-disordered breathing among patients with first-ever stroke. *J Neurol.* 2000;247:41-47.
- Wickrema A, Krantz SB, Winkelmann JC, Bondurant MC.** Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells. *Blood.* 1992;80:1940-1949.
- Widimsky J, Urbanova D, Ressler J, Ostadal B, Pelouch V, Prochazka J.** Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc Res.* 1973;7:798-808.
- Wiebers DO, Adams HP Jr, Whisnant JP.** Animal models of stroke: are they relevant to human disease? *Stroke.* 1990;21:1-3.
- Wiener CM, Booth G, Semenza GL.** In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;225:485-488.
- Wiessner C, Allegrini PR, EkatoDRAMIS D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M.** Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21:857-864.
- Wilgren N.** Neuroprotection in late clinical development - a status report. *Cerebrovascular Disease.* 1997;7:13-17.
- Williams LS, Garg BP, Cohen M, Fleck JD, Biller J.** Subtypes of ischemic stroke in children and young adults. *Neurology.* 1997;49:1541-1545.
- Williams LS, Rotich J, Qi R, Fineberg N, Espay A, Bruno A, Fineberg SE, Tierney WR.** Effects of admission hyperglycemia on mortality and costs in acute ischemic stroke. *Neurology.* 2002;59:67-71.
- Wise RJ, Bernardi S, Frackowiak RS, Legg NJ, Jones T.** Serial observations on the pathophysiology of acute stroke. The transition from ischaemia to infarction as reflected in regional oxygen extraction. *Brain.* 1983;106:197-222.
- Wise SL, Meador KJ, Thompson WO, Avery SS, Loring DW, Wray BB.** Cerebral lateralization and histamine skin test asymmetries in humans. *Ann Allergy.* 1993;70:328-332.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L.** Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000;80:617-653.

- Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN.** JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. 1993;74:227-236.
- Wolf PA.** Prevention of stroke. *Lancet*. 1998;352:SIII15-SIII18.
- Wolf PA, Dawber TR, Thomas HE Jr, Kannel WB.** Epidemiologic assessment of chronic atrial fibrillation and risk of stroke: the Framingham study. *Neurology*. 1978;28:973-977.
- Wood JG, Johnson JS, Mattioli LF, Gonzalez NC.** Systemic hypoxia promotes leukocyte-endothelial adherence via reactive oxidant generation. *J Appl Physiol*. 1999a;87:1734-1740.
- Wood JG, Johnson JS, Mattioli LF, Gonzalez NC.** Systemic hypoxia increases leukocyte emigration and vascular permeability in conscious rats. *J Appl Physiol*. 2000;89:1561-1568.
- Wood JG, Mattioli LF, Gonzalez NC.** Hypoxia causes leukocyte adherence to mesenteric venules in nonacclimatized, but not in acclimatized, rats. *J Appl Physiol*. 1999b;87:873-881.
- Wood SM, Gleadle JM, Pugh CW, Hankinson O, Ratcliffe PJ.** The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. Studies in ARNT-deficient cells. *J Biol Chem*. 1996;271:15117-15123.
- Wu H, Klingmuller U, Besmer P, Lodish HF.** Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature*. 1995a;377:242-246.
- Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF.** Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. 1995b;83:59-67.
- Xue D, Slivka A, Buchan AM.** Tirilazad reduces cortical infarction after transient but not permanent focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1992;23:894-899.
- Yager JY, Thornhill JA.** The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21:167-174.
- Yajima T, Koike A, Sugimoto K, Miyahara Y, Marumo F, Hiroe M.** Mechanism of periodic breathing in patients with cardiovascular disease. *Chest*. 1994;106:142-146.

- Yamada K, Goto S, Oyama T, Inoue N, Nagahiro S, Ushio Y.** In vivo induction of the growth associated protein GAP43/B-50 in rat astrocytes following transient middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol.* 1994;88:553-557.
- Yamagami S, Tamura M, Hayashi M, Endo N, Tanabe H, Katsuura Y, Komoriya K.** Differential production of MCP-1 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the ischemic brain after transient focal ischemia in rats. *J Leukoc Biol.* 1999;65:744-749.
- Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K.** Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke.* 1995;26:676-680.
- Yamashita K, Vogel P, Fritze K, Back T, Hossmann KA, Wiessner C.** Monitoring the temporal and spatial activation pattern of astrocytes in focal cerebral ischemia using in situ hybridization to GFAP mRNA: comparison with sgp-2 and hsp70 mRNA and the effect of glutamate receptor antagonists. *Brain Res.* 1996;735:285-297.
- Yao H, Takasawa R, Fukuda K, Shiokawa D, Sadanaga-Akiyoshi F, Ibayashi S, Tanuma S, Uchimura H.** DNA fragmentation in ischemic core and penumbra in focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001;91:112-118.
- Yong VW, Moumdjian R, Yong FP, Ruijs TC, Freedman MS, Cashman N, Antel JP.** Gamma-interferon promotes proliferation of adult human astrocytes in vitro and reactive gliosis in the adult mouse brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:7016-7020.
- Yoshida K, Kakihana M, Chen LS, Ong M, Baird A, Gage FH.** Cytokine regulation of nerve growth factor-mediated cholinergic neurotrophic activity synthesized by astrocytes and fibroblasts. *J Neurochem.* 1992;59:919-931.
- Yoshimoto T, Kanakaraj P, Ying Ma J, Cheng M, Kerr I, Malaiyandi L, Watson JA, Siesjo BK, Maples KR.** NXY-059 maintains Akt activation and inhibits release of cytochrome C after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2002;947:191-198.
- Yoshimura A, Lodish HF.** In vitro phosphorylation of the erythropoietin receptor and an associated protein, pp130. *Mol Cell Biol.* 1992;12:706-715.
- Yoshimura A, Misawa H.** Physiology and function of the erythropoietin receptor. *Curr Opin Hematol.* 1998;5:171-176.

- Yuan G, Adhikary G, McCormick AA, Holcroft JJ, Kumar GK, Prabhakar NR.** Role of oxidative stress in intermittent hypoxia-induced immediate early gene activation in rat PC12 cells. *J Physiol.* 2004; 557:773-783.
- Zaman K, Ryu H, Hall D, O'Donovan K, Lin KI, Miller MP, Marquis JC, Baraban JM, Semenza GL, Ratan RR.** Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. *J Neurosci.* 1999;19:9821-9830.
- Zamzami N, Kroemer G.** The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:67-71.
- Zanjani ED, Poster J, Burlington H, Mann LI, Wasserman LR.** Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J Lab Clin Med.* 1977;89:640-644.
- Zaremba J, Skrobanski P, Losy J.** Tumour necrosis factor-alpha is increased in the cerebrospinal fluid and serum of ischaemic stroke patients and correlates with the volume of evolving brain infarct. *Biomed Pharmacother.* 2001;55:258-263.
- Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S.** Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res.* 1983;53:502-514.
- Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R.** Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2002;9:112-121.
- Zhang RL, Chopp M, Li Y, Zaloga C, Jiang N, Jones ML, Miyasaka M, Ward PA.** Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology.* 1994;44:1747-1751.
- Zhang RL, Chopp M, Zaloga C, Zhang ZG, Jiang N, Gautam SC, Tang WX, Tsang W, Anderson DC, Manning AM.** The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat. *Brain Res.* 1995;682:182-188.
- Zhang RL, Chopp M, Zhang ZG, Jiang Q, Ewing JR.** A rat model of focal embolic cerebral ischemia. *Brain Res.* 1997;766:83-92.

- Zhang WR, Kitagawa H, Hayashi T, Sasaki C, Sakai K, Warita H, Shiro Y, Suenaga H, Ohmae H, Tsuji S, Itoh T, Nishimura O, Nagasaki H, Abe K.** Topical application of neurotrophin-3 attenuates ischemic brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 1999;842:211-214.
- Zhang Z, Chopp M, Goussev A, Powers C.** Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1998;784:210-217.
- Zhang Z, Chopp M, Powers C.** Temporal profile of microglial response following transient (2 h) middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 1997;744:189-198.
- Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL.** Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 2000;60:1541-1545.
- Zhu CZ, Auer RN.** Graded hypotension and MCA occlusion duration: effect in transient focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15:980-988.
- Zhu H, Bunn HF.** Signal transduction. How do cells sense oxygen? *Science.* 2001;292:449-451.
- Zivin JA, Grotta JC.** Animal stroke models. They are relevant to human disease. *Stroke.* 1990;21:981-983.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG.** Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci.* 1986;6:2950-2967.
- Zoratti M, Szabo I.** The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1241:139-176.

