

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

Neurosciences Cognitives

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 24 novembre 2009

par

Virginie DESESTRET

**Dynamique et rôle de la réponse phagocytaire post-ischémique précoce
dans des modèles murins d'ischémie cérébrale :
Evaluation histopathologique et IRM**

Directeurs de thèse :

Professeur Norbert NIGHOGHOSSIAN

Professeur Jérôme HONNORAT

JURY :

Pr Alain VIGHETTO

Pr Romain GHERARDI

Dr Klaus PETRY

Dr Chantal REMY

Dr Serge NATAF

Pr Norbert NIGHOGHOSSIAN

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

Président de l'Université
Vice-président du Conseil Scientifique
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil des Etudes et de la
Vie Universitaire
Secrétaire Général

Professeur L. COLLET
Professeur J. F. MORNEX
Professeur J. LIETO
Professeur D. SIMON

Monsieur G. GAY

SECTEUR SANTE

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche
UFR de Médecine Lyon-Nord
UFR de Médecine Lyon-Sud
UFR d'Oncologie

Directeur : Professeur P. COCHAT
Directeur : Professeur X. MARTIN
Directeur : Professeur J. ETIENNE
Directeur : Professeur F. N. GILLY
Directeur : Monsieur O. ROBIN

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Institut Techniques de Réadaptation
Département de Formation et Centre de Recherche
en Biologie Humaine

Directeur : Professeur F. LOCHER
Directeur : Professeur MATILLON
Directeur : Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

UFR de Physique
UFR de Biologie
UFR de Mécanique
UFR de Génie Electrique et des Procédés
UFR Sciences de la Terre
P.HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques
UFR d'informatique
UFR de Chimie Biochimie
UFR STAPS
COLLIGNON
Observatoire de Lyon
Institut des Sciences et des Techniques de
Ingénieur de Lyon
IUT A
IUT B
LAMARTINE
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Professeur S. FLECK
Directeur : Professeur H. PINON
Directeur : Professeur H. BEN HADID
Directeur : Professeur G. CLERC
Directeur : Professeur

Directeur : Professeur A. GOLDMAN
Directeur : Professeur S. AKKOUCHE
Directeur : Professeur H. PARROT
Directeur : Professeur C.

Directeur : Professeur R. BACON
Directeur : Professeur J. LIETO

Directeur : Professeur M. C. COULET
Directeur : Professeur R.

Directeur : Professeur J. C. AUGROS

INFORMATIONS SUR LES EXPERIMENTATIONS

Toutes les personnes impliquées dans ces protocoles expérimentaux (modèles ischémiques, cultures primaires de moelle osseuse, cultures organotypiques hippocampiques) possèdent les formations adéquates relative à l'expérimentation animale (n° personnel d'agrément 69388279). Tous les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le CREEA (comité d'éthique en expérimentation animale de la région Rhône-Alpes) n° 237 modifié.

Les expérimentations ont été effectuées au SCAL (Service commun d'animalerie de Laennec)-

Agrément des locaux d'expérimentation n° 69-388-0301 (Mai 2004).

Ce travail de thèse a été co-dirigé par N. Nighoghossian (Créatis) et J. Honnorat (UMR-S 842).

La deuxième étude a bénéficié d'une collaboration avec l'équipe "Cardioprotection" de l'unité Inserm U886 (R. Ferrera, D. Angoulvant, M. Ovize).

Au Président du Jury,

Monsieur Alain VIGHETTO. Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de présider ce jury. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Aux rapporteurs de ce travail,

Monsieur Romain GHERARDI et Monsieur Klaus PETRY. Merci d'avoir accepté d'examiner ce travail et pour vos remarques et conseils judicieux. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Aux examinateurs de ce travail,

Madame Chantal REMY. Merci d'avoir accepté de participer à ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Monsieur Serge NATAF. Merci de m'avoir accompagnée dans cette thèse et d'avoir relancer la machine quand il le fallait. Merci pour la liberté accordée et ta disponibilité.

Monsieur Norbert NIGHOGHOSSIAN. Merci pour votre confiance, votre engagement et votre enthousiasme tout au long de ce travail que vous avez initié et encadré. Permettez-moi de vous exprimer toute ma reconnaissance.

A Jérôme
Pour m'avoir accueillie et guidée avec efficacité et bienveillance

Merci Marlène,
A l'origine de ce travail
Pour tes qualités humaines et scientifiques et ton optimisme qui ont été plus que précieux
pendant ces 3 années de collaboration

A JC, co-thésard forever,
A nos nocturnes pMCAO, BCAO, tMCAO ...
et surtout à Léo

A Samir,
qui a définitivement 2 mains droites

A Emilie, pour sa tenacité,

Et à toutes l'équipe " Ischémie cérébrale " de Créatis

A Toute l'équipe de l'Unité 842,
A Mireille,
qui m'a accueillie et initiée aux joies de la salle d'histo,

A Marcel,
pour le coup de pouce qui m'a remise sur les rails

A Josy, pour ton aide précieuse

A Sylvie, Pascale, Arlette et Monique, pour votre gentillesse et votre optimisme,

A Anne, pour tes petites attentions chaleureuses (dans ce monde de brutes),

A Michel, Patrick, Saïd, Eric, Nath et Karine pour vos conseils et votre bienveillance

A Angélique, A Seb, hauts les cœurs !

A Charlotte et Marie, pour l'ambiance chaleureuse de ce bureau

A ma mère,
Pour son soutien indéfectible, son amour inconditionnel et ses prières ;
Pour notre CAP de plomberie, les jerricans arhumatisés, les cueillettes de figues périlleuses,
Et la piscine municipale des Roches
Mille fois misoatra maman,

A mon frère (prodigue !),
Parce qu' " être sa grande sœur c'est mieux qu'être enfant unique " ,

A Annie et Jacques, ma famille Mino,
A Françoise et Claude, ma famille Clément

A Nicolas,
Pour ton CMH extraordinaire

A Sara, coach ès-docteur,
Pour ta patience, les tableaux Excell arrosés, la menthe aquatique ...et tout le reste
A Anne-Gaëlle,
Pour son amitié multi-résistante et ses conseils multi-domaines,
Pour les rires et les pleurs passés et à venir !
A Marilou,
Pour sa fidélité et son enthousiasme
A Maité,
Pour son amitié assurance tout-risques
A Antoine et Greg,
Qui auraient du venir !

A mes co-internes, sans qui je n'aurais jamais pu boucler cette thèse
A Amandine (et Benoit !) pour sa bienveillance parfois sacrificielle,
A Ange (et Eric),
qui a essayé de m'apprendre à marcher sans courir dans les couloirs du Neuro,
Pour sa sagesse Abidjanaise
A Amandine,
Tout doucement ... mais sûrement,
Pour sa sagesse Lyonnaise
A Aurélie,
Sa gentillesse et son humilité
A Manu,
Pour m'avoir initiée aux joies méconnues de la Macro,
aux M& M's

A mes chefs-amis et néanmoins amis,
A Tae Hee,
Pour nos tentatives ischémiques Suisse et Lilloise et nos piscines mexicaines,
A Anne-Evelyne et la petite famille,
Pour son énergie et sa bienveillance
A Servane, merci Chef !
A Stéph, ma chef forever

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
AVANT-PROPOS	5
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	7

1^{ERE} PARTIE : L'ISCHEMIE CEREBRALE

<u>I) Aspects cliniques et épidémiologiques</u>	8
I. 1) Les situations cliniques: les pathologies ischémiques cérébrales	8
I. 2) Les données épidémiologiques	8
<u>II) Aspects neuropathologiques</u>	9
II. 1) Infarctus, lacunes et lésions ischémiques aiguës généralisées	9
II. 2) Les infarctus	9
II. 2. a) Mécanismes et topographie des infarctus	9
II. 2. a. α) Thromboses, embolies et sténoses	
II. 2. a. β) Les facteurs hémodynamiques	
II. 2. a. γ) Les topographies des AVC	
II. 2. b) Description neuropathologique des infarctus	13
II. 2. b. α) L'histoire naturelle de l'infarctus "pâle"	
II. 2. b. β) La variante hémorragique	
II. 3) Les lacunes	17
II. 4) Les nécroses ischémiques généralisées : incomplètes et sélectives	17
<u>III) Aspects physiopathologiques</u>	19
III.1) Ischémie cérébrale et débit sanguin cérébral	19
III. 2) Le concept de pénombre ischémique	20
III. 2. a) Le concept originel	20
III. 2. b) les méthodes d'évaluation de la pénombre ischémique	21
III. 2. b. α) La tomographie à émission de positons (TEP)	
III. 2. b. β) L'imagerie en résonance magnétique (IRM)	
III. 2. b. γ) Pénombre ischémique, la discordance TEP et IRM...	
III. 2. b. δ) Perspectives	
III. 3) Effets de l'ischémie sur les neurones	25
III. 3. a) La perte neuronale	25
III. 3. b) Les mécanismes de mort neuronale : nécrose et apoptose	25
III. 3. c) Ischémie et modifications synaptiques	26

<u>IV) Les modèles expérimentaux d'ischémie</u>	27
IV. 1) Les modèles in vivo	27
IV. 1. a) Les principes généraux et " historiques ":	27
IV. 1. a. α) La recherche d'un anthropomorphisme anatomique	
IV. 1. a. β) La recherche d'un anthropomorphisme pathologique	
IV. 1. a. γ) La classification historique des modèles	
IV. 1. b) Les facteurs de variabilité et mortalité communs	31
IV. 1. b. α) Les modalités d'anesthésie	
IV. 1. b. β) La température	
IV.1.c) Les modèles actuels :	32
IV.1 c. α) Le modèle d'ischémie globale par occlusion bicarotidienne	32
IV.1.c. α) i) La perméabilité du polygone de Willis: facteur de variabilité	
IV.1.c. α) ii) Une vulnérabilité sélective au sein de l'hippocampe.	
IV.1.c. α) iii) La durée de l'ischémie transitoire : une variable modulable	
IV.1.c. β) Les modèles d'occlusion de ACM: Modèles d'AVC sylvien	35
IV.1.c. β) i) La sélection du modèle d'AVC	
IV.1.c. β) ii) Les modèles « emboliques »	
IV.1.c. β) iii) Les modèles d'occlusion permanente	
IV.1.c. β) iiiii) Les modèles d'occlusion transitoire par la méthode du fil intraluminal	
IV. 2) Les modèles in vitro	40

2^{EME} PARTIE : LA REACTION INFLAMMATOIRE AU COURS DE L'ISCHEMIE CEREBRALE

<u>I) Les phénomènes inflammatoires au centre de la "cascade ischémique "</u>	42
I.1) Des effets non univoques et réciproques	42
I.2) Objets et limites de l'étude des phénomènes inflammatoires post-ischémiques	43
I.3) Les molécules de la réponse inflammatoire post-ischémique	44
I. 3. a) Cytokines et chimiokines	44
I. 3. b) Les molécules d'adhésion	48
I. 3. c) Les dérivés de l'acide arachidonique	50
I. 3. d) Les radicaux libres	51
I.4) La dynamique schématique de la réponse inflammatoire cellulaire	53
<u>II) Une réaction inflammatoire dominée par les cellules du système des phagocytes mononucléés</u>	54
II.1) Les cellules du système des phagocytes mononucléés (PM)	54
II. 1. a) Les macrophages tissulaires	55
II. 1. a. α) Origine	55
II. 1. a. β) Fonctions	56
II. 1. a. β) i) La phagocytose	
II. 1. a. β) ii) Rôle trophique	
II. 1. a. β) iii) Régénération /réparation	
II. 1. a. γ) Macrophages activés	57
II.1. a. γ) i) Macrophages activés classiquement M1	
II.1. a. γ) ii) Macrophages activés alternativement M2	

II. 1. b) Les macrophages du SNC	59
II. 1. b. α) La microglie	59
II. 1. b. α) i) Origine des cellules microgliales	
II. 1. b. α) ii) Morphologie et phénotype des microglies	
II. 1. b. α) iii) Fonctions des cellules microgliales	
II. 1. b. β) Les cellules périvasculaires ou cellules de Mato	66
II. 1. b. γ) Les macrophages méningés	66
II. 2) Dynamique de la réaction phagocytaire mononucléée	68
II. 2. a) Les méthodes d'étude de cette réaction phagocytaire et leurs limites	68
II. 2. b) Description de la réaction phagocytaire mononucléée centrale	69
II. 2. b. α) Mise en évidence d'une accumulation et activation microgliale	
II. 2. b. β) Démonstration d'un recrutement de macrophages dérivés du sang	
II. 2. b. γ) Dynamique spatio-temporelle de la réponse phagocytaire	
II. 2. b. δ) Arguments en faveur d'une prolifération microgliale	
II. 2. b. ϵ) Arguments en faveur d'une perte microgliale	
II. 2. c) Immunosuppression périphérique et implication des monocytes circulants	
II.3) Le rôle ambivalent de la réaction microgliale post-ischémique	75
II. 3. a) Effets délétères	75
II. 3. b) Effets bénéfiques	76
<u>III) Les autres cellules impliquées dans la réaction inflammatoire post-ischémique</u>	79
III. 1) Les astrocytes	87
III. 2) Les constituants de la barrière hémato-encéphalique altérée	88
III. 3) Les cellules immunitaires sanguines : neutrophiles et lymphocytes	90
III. 3. a) Les polynucléaires neutrophiles	
III. 3. b) Les lymphocytes	
<u>3^{EME} PARTIE : IMAGERIE DE LA NEUROINFLAMMATION POST-ISCHEMIQUE</u>	
<u>I) Principes de l'IRM utilisant des particules nanoparticules de fer comme produit de contraste</u>	86
I.1) Les produits de contraste superparamagnétiques : définition, composition, synthèse, stabilisation, coating	87
I. 2) Propriétés physico-chimiques et effets paramagnétiques/séquences	88
I. 3) Propriétés "biologiques" des nanoparticules	90
<u>II) Applications des USPIO à l'imagerie cellulaire de l'inflammation</u>	93
II.1) Marquage in vivo par injection systémique	94
II. 1. a) Principes du marquage et historique des applications en imagerie biomédicale	
II. 1. b) Applications à l'imagerie de la neuroinflammation post-ischémique	95
II. 1. b. α) Expérimentales	96
II. 1. b. β) Cliniques	103
II. 1. b. γ) Apports des études et questions ouvertes	105
II 2) Marquage in vitro (ex vivo)	107

III) Comparaison avec la technique d'imagerie in vivo de l'activation macrophagique par tomographie par émission de positons (PET) 109

CONCLUSION 112

OBJECTIFS 113

RÉSULTATS 114

Etude 1: Early-Stage Investigations of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide-Induced Signal Change After Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice

Etude 2: Macrophages but not endogenous microglia efficiently prevent ischemia-induced neuronal cell death

DISCUSSION GENERALE 120

I) Interêts et limites de l'imagerie par IRM avec USPIO dans l'étude de la réaction phagocytaire aux stades précoces post-ischémiques

II) Effet de l'hypoxie sur les neurones et les cellules microgliales

III) Rôle des interactions précoces entre le tissu cérébral ischémié et les phagocytes sanguins

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 131

BIBLIOGRAPHIE 133

ANNEXE 157

Etude 3: Quantitative effects of cell internalization of two types of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles at 4.7 T and 7 T.

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe " Ischémie cérébrale" du laboratoire de recherche en imagerie biomédicale Créatis et l'unité UMR-S842 Inserm" Neuro-oncologie et neuro-inflammation". Cette collaboration est fondée sur la convergence thématiques et la complémentarité méthodologique de ces 2 équipes. En effet, l'une des thématiques développée au sein de l'unité U842 vise à définir les mécanismes régissant la migration des cellules immunes vers le système nerveux central en conditions pathologiques. Or les interactions entre les systèmes nerveux et inflammatoires participent à la physiopathologie des lésions ischémiques cérébrales. Cette réaction inflammatoire post-ischémique est en particulier dominée par les phagocytes mononucléés composés des cellules microgliales (cellules immunocompétentes du parenchyme cérébral) et des macrophages qui dérivent du sang et infiltrent le tissu cérébral lésé. La compréhension de ces mécanismes neuro-inflammatoires au cours de l'ischémie cérébrale reste partielle. Le rôle (bénéfique ou délétère) joué par ces cellules myéloïdes au décours du processus ischémique est notamment controversé. La conception d'un outil d'évaluation *in vivo* pour le suivi longitudinal de ces populations myéloïdes est le premier objectif qui a motivé cette collaboration.

Afin de suivre, *in vivo*, et de manière non invasive, la dynamique de ces cellules phagocytaires myéloïdes inflammatoires, notre équipe a mis au point une approche expérimentale innovante associant imagerie par résonance magnétique (IRM) haute résolution et injection intraveineuse de nanoparticules d'oxyde de Fer (USPIO) dans un modèle murin d'ischémie cérébrale focale. La validation de cette approche d'imagerie cellulaire a nécessité une confrontation entre les signaux IRM et la distribution histologique du produit de contraste et des cellules phagocytaires. Cette approche a contribué à la description dynamique de l'infiltration macrophagique tardive. Cependant, la séquence spatio-temporelle précise de l'activation microgliale et du recrutement macrophagique, intriqués avec des altérations de la barrière hémato-encéphalique au cours des premières heures post-ischémie, restait mal élucidée. Un des objectifs de ce travail a été justement de mieux comprendre la relation entre les signaux IRM observés après injection d'USPIO et la réaction phagocytaire aux temps précoces post-ischémie dans un modèle expérimental développé chez la souris. Cette approche expérimentale constitue un préalable indispensable à l'utilisation et à l'interprétation de l'imagerie IRM avec USPIO chez l'homme.

Après l'étude de la dynamique de cette infiltration macrophagique, nous nous sommes intéressés à l'effet du recrutement des cellules inflammatoires dérivés du sang sur le tissu cérébral lésé. En effet, le rôle spécifique de ces macrophages infiltrant n'a été que peu étudié, en particulier en raison des difficultés à distinguer les macrophages infiltrant des cellules microgliales d'origine cérébrale. Afin de surmonter cette difficulté, nous avons développé un modèle d'hypoxie cérébrale *in vitro* réalisée sur culture de tissu hippocampique, permettant d'étudier séparément les 2 composantes phagocytaires de la réaction post-ischémique. Il s'agit d'un modèle d'ischémie globale reproduisant une situation pathologique ischémique différente de l'AVC, représenté par les hypoxies et anoxies cérébrales. Ces données *in vitro* ont été confrontées à des données *in vivo* obtenues dans un 3^{ème} modèle développé au cours de cette thèse produisant une ischémie cérébrale globale transitoire chez la souris. Ces trois modèles nous ont permis de reproduire expérimentalement les 2 situations ischémiques cliniques : les accidents ischémiques constitués en relation avec une ischémie focale et les anoxies cérébrales globales.

Un autre parti pris de ce travail était la fenêtre temporelle ciblée pour l'évaluation de la dynamique et de l'impact du recrutement macrophagique. Ces mécanismes ont été étudiés au cours des 24 premières heures post-ischémie, c'est-à-dire pendant la période où se déroule le recrutement des phagocytes sanguins, parallèlement à la constitution des lésions ischémiques sévères et immédiates. Ces premières heures où le dialogue entre le système immunitaire et le tissu cérébral ischémié s'installe, sont considérées comme la "fenêtre de tir idéale" des thérapies neuroprotectrices.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Ce travail de thèse s'intéresse à la réaction inflammatoire phagocytaire post-ischémique

La 1^{ère} partie de ces rappels bibliographiques concerne l'ischémie cérébrale, ses aspects cliniques et expérimentaux.

La 2^{ème} partie est consacrée à la réaction inflammatoire post-ischémique, ses aspects cellulaires et moléculaires.

La 3^{ème} partie est dévolue à l'imagerie de cette réaction inflammatoire post-ischémique, notamment par résonance magnétique

1^{ERE} PARTIE: L'ISCHEMIE CEREBRALE

I) ASPECTS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DE L'ISCHEMIE CEREBRALE

I.1) Les situations cliniques : les pathologies ischémiques cérébrales

L'ischémie cérébrale résulte de l'interruption ou de la diminution de l'apport en oxygène, consécutive à une chute du débit sanguin cérébral et/ou plus rarement à une hypoxie. On distingue schématiquement, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), conséquence d'une ischémie focale par occlusion d'une ou plusieurs artères cérébrales et les hypoxies-anoxies globales. Chez l'adulte, les hypoxies globales sont secondaires aux défaillances cardio-respiratoires, aux asphyxies et aux intoxications au monoxyde de carbone. Chez l'enfant, l'hypoxie néonatale survient dans le cadre des détresses respiratoires néonatales et des réanimations de mort-subites du nourrisson.

I.2) Les données épidémiologiques :

Les mécanismes ischémique et hémorragique sont respectivement la cause de 80% et 20% des AVC. L'AVC est un enjeu majeur de santé publique, il représente la deuxième cause de décès à travers le monde (Strong et al., 2007) (Murray and Lopez, 1997), la première cause de handicap acquis et la seconde cause de démence (Pendlebury and Rothwell, 2009). L'incidence moyenne des AVC en Europe varie de 200 à plus de 600 pour 100 000 h/an et la prévalence moyenne est de 2400 patients pour 1 million d'habitants avec 54% de patients décédés ou dépendants, dont 20% de décès au cours du premier mois (The European Registers of stroke, 2009)(Kelly-Hayes et al., 2003; Warlow, 1998). Le coût lié à la prise en charge et au handicap varie de 2 à 6% du budget global des soins de santé dans les pays occidentaux (Rosamond et al., 2007).

L'encéphalopathie hypoxique-ischémique périnatale touche 1 naissance sur 4000 et ce chiffre ne diminue pas en dépit des progrès en obstétrique et néonatalogie. Les difficultés de l'adaptation néonatale, les détresses respiratoires et les apnées ont pour conséquences l'apparition d'épisodes d'hypoxie, cause majeure de mortalité et de séquelles irréversibles chez les nouveaux-nés (Boog, 2001). En effet, 25 à 30 % des enfants survivants à une hypoxie-ischémie néonatale présentent des troubles psycho-moteurs. La prévention de l'hypoxie néonatale et la compréhension de ses mécanismes physiopathologiques constituent un enjeu majeur (Grenier A, 2005).

II) LES ASPECTS NEUROPATHOLOGIQUES

Ces rappels neuropathologiques ont été rédigés d'après :

Bogousslavsky J. et al. Accidents vasculaires cérébraux. Doin Editions 1998.

Manual of Basic Neuropathology. Gray F. et al. 4^{ème} édition 2004.

Greenfield's Neuropathology. Oxford University Press, USA; 7th edition

Illustration d'après "les dessins du dimanche" du Pr Tommasi (Service de neuropathologie. Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, Lyon)

Cours DESC Neuropathologie. Pr J.J. Hauw 2008 (laboratoire de Neuropathologie Hôpital de la Pitié Salpêtrière).

II.1) Infarctus, lacunes et lésions ischémiques aiguës généralisées : Définitions

Le terme d' "**infarctus**" cérébral ou bien de "**ramollissement**" ou encore de "**malacie**" désigne un foyer de nécrose ischémique du tissu cérébral localisé dans un territoire vasculaire. Il peut occuper tout un territoire irrigué par une artère ou siéger à la limite des territoires de 2 artères voisines ; on parle dans ce cas d'infarctus jonctionnels corticaux ou sous corticaux. Dans la plupart des cas, l'infarctus est du à l'occlusion aiguë d'un tronc artériel, mais il peut aussi être secondaire à une diminution importante et brutale du débit sanguin cérébral sans occlusion artérielle (bradycardie majeure, choc hypovolémique). Dans cette dernière situation, la présence de sténoses artérielles extra/intracrâniennes constitue un facteur favorisant. Ce mécanisme reste toutefois exceptionnel en raison de la capacité d'autorégulation cérébrale (Powers et al., 1984).

Le terme de "**lacune**", ou "**micromalacie**", est réservé aux petits infarctus liés à l'occlusion d'artérioles perforantes profondes.

Enfin, les conséquences diffuses de la baisse globale du débit circulatoire ou des anoxies aiguës sont des **nécroses ischémiques aiguës généralisées incomplètes et sélectives** qui sont désignées en fonction des territoires sélectivement atteints : par exemple la nécrose du ruban cortical, la nécrose laminaire du corps calleux, ou l'atteinte bipallidale sélective en cas d'intoxication au CO etc. (cf § II)4).

II. 2) Les infarctus

II. 2. a) Mécanismes et topographie des infarctus

II. 2. a. α) Thromboses, embolies et sténoses

La plupart des infarctus sont dus à une occlusion artérielle dont la cause peut être une thrombose in situ ou une embolie.

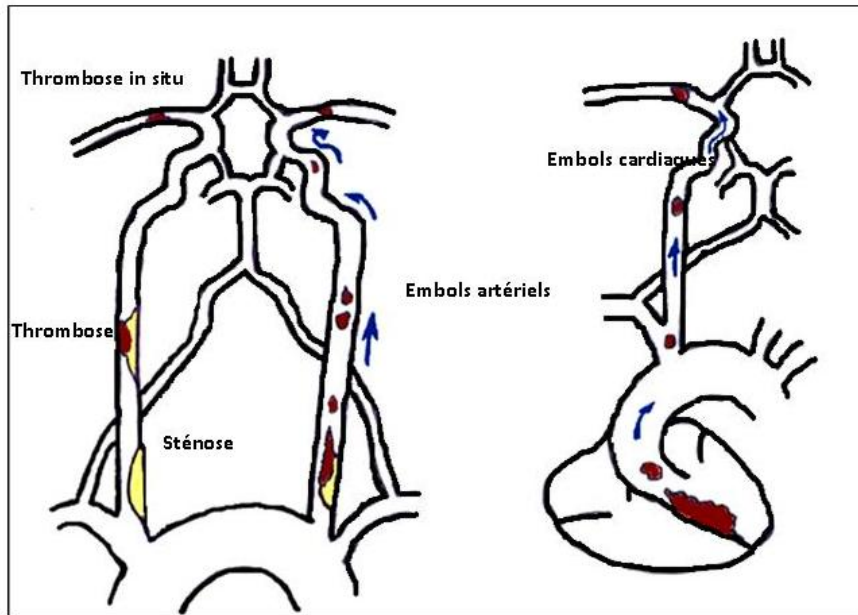


Figure 1: Mécanismes des AVC ischémiques: Thromboses, embolies et sténoses
D'après les dessins du Pr. Tommasi

La thrombose est souvent développée sur des plaques d'athérome instables. L'embolie peut être soit d'origine cardiaque soit d'origine artérielle (**Figure 1**). Plus rarement, la cause de l'infarctus est un spasme artériel (angiopathie aigüe plus ou moins réversible) ou une hypotension sévère et prolongée survenant sur un arbre vasculaire déjà le siège de sténoses athéromateuses serrées multifocales.

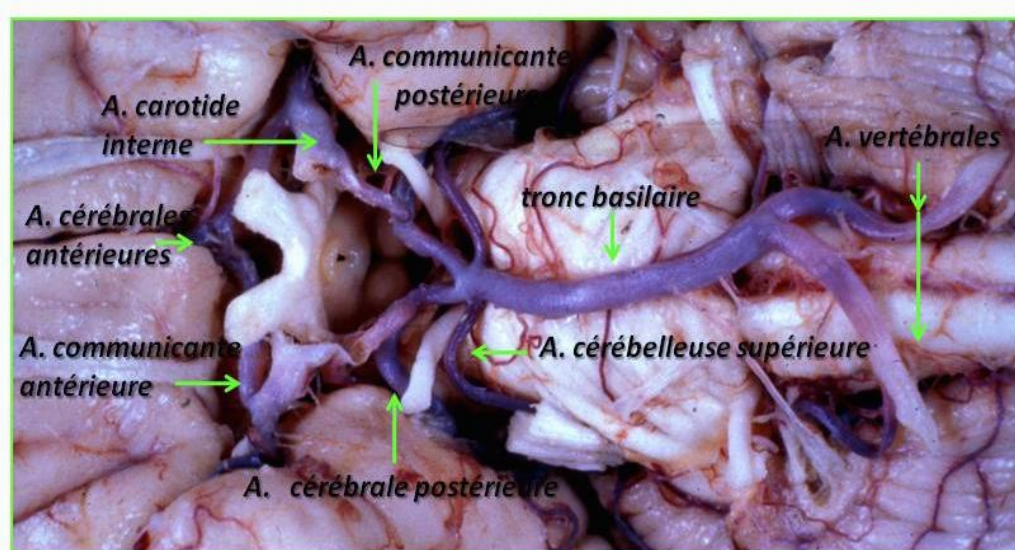


Figure 2: Polygone de Willis
(photo anatomique Dr A. Jouvét)

La variété des mécanismes à l'origine des infarctus cliniques explique la diversité des modèles animaux d'AVC développés pour reproduire ces différents mécanismes. L'aspect, la topographie et l'étendue de la lésion sont principalement liés aux facteurs hémodynamiques qui conditionnent le choix des modèles expérimentaux (cf § IV.1)

II. 2. a. β) Les facteurs hémodynamiques

Trois systèmes d'anastomoses à l'origine de suppléances artérielles sont susceptibles d'être mises en jeu en cas d'interruption pathologique du flux sanguin :

- Les anastomoses cervicales : par exemple entre une branche de l'artère faciale (issue de la carotide externe) et l'artère ophtalmique (branche distale de la carotide interne) ou bien entre les branches de l'artère occipitale et les rameaux musculaires de la vertébrale (nœud de Bosniac dans le triangle de Tillaux) ;
- Le cercle de Willis (anastomose des gros vaisseaux de la base du crâne) reliant les origines des grosses artères intracrâniennes (**Figure 2**) ;
- Les anastomoses superficielles, par exemple cortico-méningées.

L'efficacité de ces suppléances est variable en fonction des dispositions anatomiques d'un sujet à l'autre (absence, hypoplasie, agénésie d'un segment artériel). Par ailleurs, la présence des anastomoses ne préjuge pas de leur caractère fonctionnel. Par exemple, en cas de maladie athéromateuse, ces anastomoses peuvent elles-mêmes être atteintes et donc non fonctionnelles. En outre, des résistances artérielles élevées, dans le cas d'une microangiopathie hypertensive par exemple, peuvent compromettre la mise en jeu de ces voies de suppléance.

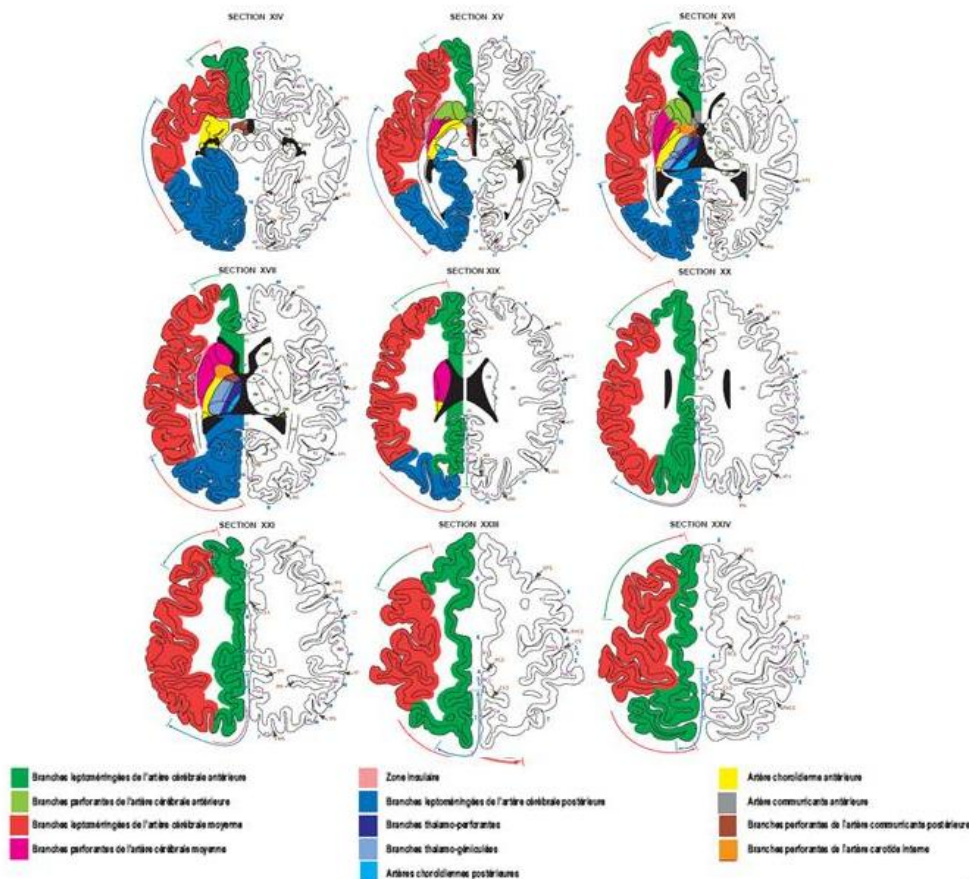
La mise en jeu éventuelle de ces suppléances va par ailleurs dépendre du niveau de l'occlusion artérielle. Les occlusions basses dans l'arbre vasculaire céphalique mettent volontiers en jeu les anastomoses proximales comme le polygone, alors que les occlusions hautes ne peuvent recruter que les suppléances distales, moins fonctionnelles.

La vitesse de l'arrêt ou de la diminution du flux circulatoire est un autre facteur influençant la mise en œuvre d'éventuelles suppléances. Schématiquement, la constitution progressive d'une thrombose sur plaque d'athérosclérose autorise la mise en jeu des réseaux de suppléances potentielles, contrairement à une occlusion brutale par embolie.

Concernant le développement de modèles expérimentaux, nous verrons l'importance de la prise en compte de ces suppléances et de leur variabilité inter-espèce pour le choix de l'espèce animale (**IV. 1. a) α**).

Un autre facteur choisi au cours du développement d'un modèle est la topographie de la lésion dont le choix est logiquement guidé par les territoires vasculaires atteints dans les AVC cliniques.

II. 2. a. γ) Les topographies des AVC



On distingue les AVC du système carotidien et du territoire vertébro-basilaire.

Le système artériel carotidien est constitué par les territoires des branches de division de l'artère carotide interne :

Le territoire de l'**artère cérébrale moyenne** (ACM ou sylvienne) est le plus souvent atteint (55 à 75% des AVC hémisphériques), et souvent de façon isolée (55%). L'infarctus sylvien peut affecter l'ensemble (AVC sylvien total) ou une partie seulement du territoire (AVC sylvien superficiel ou profond). Cette fréquence des AVC sylviens en clinique explique que la

plupart des modèles d'AVC consistent en des occlusions expérimentales de l'artère cérébrale moyenne.

Le territoire de **l'artère cérébrale antérieure** (ACA) est plus rarement atteint (10 à 12% des AVC) et rarement de façon isolée (10 à 20% des infarctus de l'artère cérébrale antérieure). L'ischémie est souvent par contre bilatérale (dans 35% des cas) en raison d'une naissance commune des artères cérébrale antérieures ou d'une hypolasie du segment A1 de cette artère, voire l'atteinte concomitante de l'artère communicante antérieure.

L'infarctus du territoire de **l'artère choroïdienne antérieure** est rare et isolé dans 8% des cas (Ois et al., 2009). Il accompagne en général un AVC du territoire carotidien

Les AVC jonctionnels superficiels dans le système carotidien sont assez rares (5 à 12% des AVC carotidiens) et affectent en général les territoires limitrophes des artères cérébrales antérieure et moyenne et plus rarement le territoire jonctionnel entre les artères cérébrales moyenne et postérieure. On distingue également les AVC jonctionnels profonds observés à la limite du territoire des artères perforantes de l'ACM et de l'ACA.

Le système postérieur ou vertébro-basilaire est constitué par un axe médian (le **tronc basilaire** formé par la jonction des 2 artères vertébrales), lequel donne les 2 artères cérébrales postérieures. Une grande variabilité anatomique caractérise cette vascularisation postérieure et ses anastomoses avec le système carotidien via les artères communicantes postérieures. Ces particularités anatomiques expliquent la fréquence des lésions bilatérales et asymétriques au cours des AVC de la circulation postérieure. C'est notamment souvent le cas des infarctus de **l'artère cérébrale postérieure** qui représentent 15 à 20% des AVC hémisphériques. Les AVC cérébelleux sont également fréquents et souvent associés à des lésions du tronc cérébral.

II. 2. b) Description neuropathologique des infarctus

On décrit 2 grands types d'infarctus ischémiques : le ramollissement "pâle" et l'infarctus hémorragique au cours duquel des phénomènes hémorragiques viennent compliquer la nécrose tissulaire.

II. 2. b. α) L'histoire naturelle de l'infarctus "pâle"

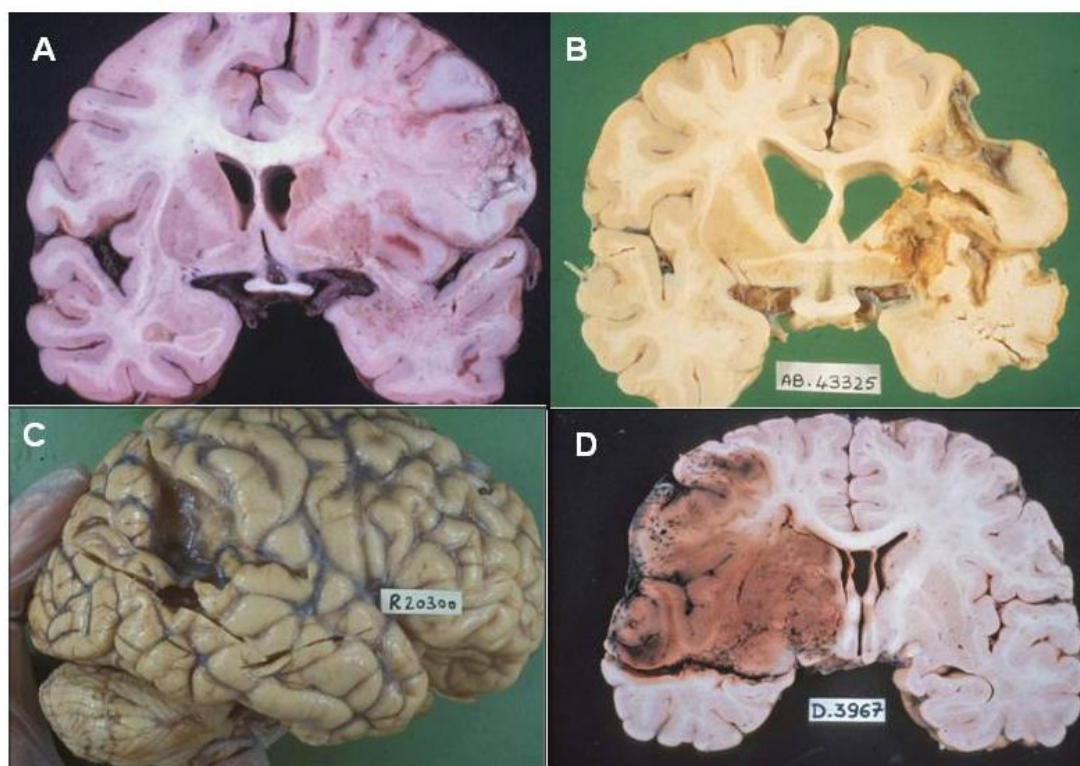


Figure 4: Aspects macroscopiques des AVC ischémiques

A: Ramollissement récent. B: Ramollissement ancien

C: Cicatrice d'infarctus kystique.

D: Ramollissement hémorragique

(photographies anatomiques Dr A. Jouvet)

Quelle que soit la topographie de l'infarctus, il est en général possible d'identifier macroscopiquement et microscopiquement une série de changements séquentiels définissant schématiquement 3 phases successives et souvent intriquées :

- une phase de mort cellulaire et d'installation de l'œdème
- une phase d'œdème et de déterision
- une phase de cicatrisation

Macroscopiquement, ces différentes phases vont se traduire dans les 6 premières heures par une absence de lésions visibles à l'œil nu. Entre 8h et 48h, la zone lésée se décolore (malacie) et la démarcation substance blanche/substance grise disparaît alors que les limites lésionnelles restent difficilement discernables. A la palpation (après fixation formolique), la lésion se distingue du parenchyme adjacent par sa mollesse (ramollissement). La congestion vasculaire est visible à ce stade, notamment en périphérie lésionnelle corticale (**Figure 4 A**). A partir de 48 heures, le tissu devient friable et les limites de l'infarctus se précisent. La

liquéfaction commence vers le 12^{ème} jour. Le processus de cavitation devient évident à partir de la 3^{ème} semaine. L'infarctus devient alors gris-jaunâtre et déprimé (**Figure 4B**) photo. Après plusieurs mois, une cavité à bords irréguliers apparaît, recouverte par de la leptoméninge sur sa face corticale et remplie de LCR (**Figure 4C**).

Microscopiquement, la séquence temporelle des altérations histologiques et cellulaires au sein de l'infarctus est résumée dans le tableau suivant :

1 h	<ul style="list-style-type: none"> •microvacuolisation intraneuronales (<i>gonflement des mitochondries</i>) •vacuolisation périneuronale (<i>gonflement des processus astrocytaires</i>)
4h-12h	<ul style="list-style-type: none"> •cytoplasmes des neurones éosinophiles •disparition des corps de Nissl •disparition des nucléoles et pycnose •gonflement des cellules endothéliales et altération de la BHE •oedèmes vasogénique et cytotoxique •extravasation érythrocytaire
15h-48h	<ul style="list-style-type: none"> •infiltration de polynucléaires neutrophiles
A partir de 48h	<ul style="list-style-type: none"> •macrophages spumeux
A partir du 5 ^{ème} jour	<ul style="list-style-type: none"> •activation/prolifération macrophagique •baisse/arrêt de l'infiltration granulocytaire
A partir d'1 semaine	<ul style="list-style-type: none"> •gliose astrocytaire limitant le foyer nécrotique

Figure 5

Le concept de pénombre, essentiel à la compréhension physiopathologique de l'accident ischémique, n'est pas un concept neuropathologique. Cette situation transitoire est naturellement méconnue par le pathologiste puisque que les constatations anatomo-pathologiques sont en général post-mortem. Par ailleurs, la finesse de l'analyse morphologique, réalisée sur une fine épaisseur de tissu (inférieure à 20 microns), ne permet peut être pas de mettre en évidence d'éventuelle corrélation avec des données métaboliques analysant globalement l'état métabolique d'une tranche tissulaire (centrimétrique). Or ce sont ces données métaboliques qui sont à l'origine du concept de pénombre cf II) 2) a)).

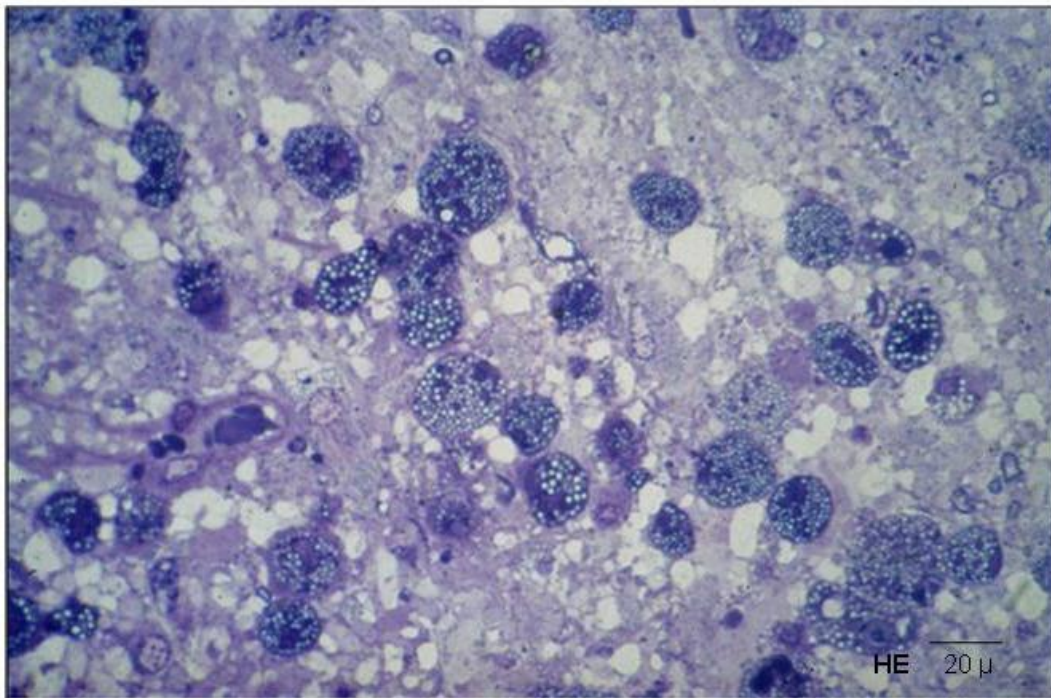


Figure 5: Réaction macrophagique au 6^{ème} jour (*microphotographie Dr A. Jouvet*)

II. 2. b. β) La variante hémorragique

La présence de larges plages confluentes de pétéchies évoluant aux stades plus tardifs en dépôts d'hémosidérine, définissent le caractère "hémorragique" de l'infarctus versus "pâle". Cette évolution est liée à la "reperfusion" du tissu nécrosé soit par la lyse spontanée ou la mobilisation de l'embolie ou la mise en œuvre efficace des suppléances (**Figure 4D**). Ainsi, une transformation hémorragique peut survenir spontanément, et parfois dès les premières heures, au sein du foyer d'infarctus cérébral. Ce risque hémorragique est accru par l'administration d'héparine ou d'un traitement thrombolytique (Hacke et al., 2008).

Les phénomènes inflammatoires secondaires à l'ischémie semblent être impliqués dans ces transformations hémorragiques par différents mécanismes : activation des métalloprotéinases (Rosenberg et al., 1998) (Asahi et al., 2001) (Gautier et al., 2003) (Sumii and Lo, 2002) (Wang et al., 2008b) ou altérations oxydatives de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Asahi et al., 2000).

Une meilleure compréhension de ces phénomènes inflammatoires de la cascade ischémique (cf 2^{ème} partie de cette introduction) devrait permettre de mieux évaluer et peut-être de limiter les risques de complications hémorragiques au cours de l'histoire naturelle de l'infarctus et après thrombolyse.

II. 3) Les lacunes

Il s'agit d'un petit infarctus ischémique, de 1 à 20 mm, en général "pâle", secondaire à l'occlusion d'une petite artère ou d'une artériole perforante (de 100 à 300 microns). Le mécanisme est dominé par l'artériosclérose consécutive à l'hypertension artérielle, mais des mécanismes emboliques sont parfois évoqués. Ces lacunes siègent donc dans le territoire des artères perforantes occluses. Elles sont classiquement retrouvées dans les noyaux gris, le territoire médian du pont au niveau du tronc cérébral, et dans la substance blanche hémisphérique et cérébelleuse. Histologiquement, les lacunes, souvent multiples, aux limites parfois irrégulières, peuvent contenir des sidérophages et évoluent vers une gliose astrocytaire. Bien que très fréquentes et probablement cliniquement particulièrement délétères, il existe finalement peu de modèles animaux reproduisant fidèlement ces infarctus lacunaires (cf §IV I).

II. 4) Les nécroses ischémiques généralisées : incomplètes et sélectives

Ces lésions sont caractérisées par leur caractère à la fois diffus et sélectif. En effet, ces lésions ischémiques, semblables par ailleurs sur le plan microscopique (neurones ischémiques éosinophiles puis atrophie) à celles précédemment décrites au sein des infarctus, siègent dans des zones de vulnérabilité schématisées sur la **figure 6** :

Cette vulnérabilité sélective est responsable des tableaux neuropathologiques classiques :

- nécrose du ruban cortical diffuse ou limitée aux territoires vasculaires limitrophes (**6B et C**),
- atteinte bipallidale classique des intoxications au CO (**6D**),
- atrophie des couches pyramidales hippocampique dans le territoire de Sommer (**6E**),
- atrophie des cellules de Purkinje,
- atrophie ischémique néonatale.

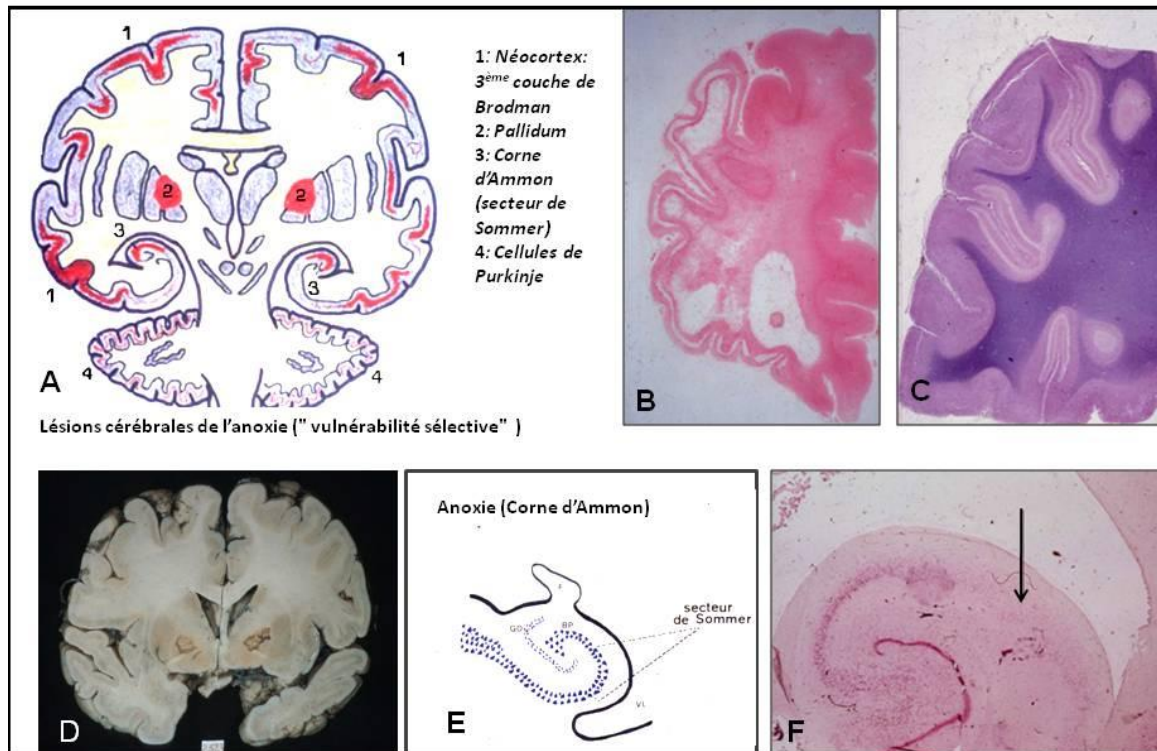


Figure 6: Zones de vulnérabilité sélective à l'hypoxie généralisée
(d'après les dessins de M Tommasi-Microphotographie Dr A. Jouvet)

Cette vulnérabilité sélective est encore assez mal comprise et souvent mise sur le compte du type de vascularisation (terminale) et du métabolisme particulier de ces cellules de grande taille (neurones pyramidaux et Purkinje), les rendant vulnérables à l'hypoxie. Le développement de modèles d'ischémie globale (cf IV) devrait permettre de mieux comprendre cette vulnérabilité sélective ainsi que le mode évolutif souvent différé de ces lésions faisant suspecter des mécanismes apoptotiques prédominants (Horn and Schlote, 1992). En effet, on distingue dans ces atteintes ischémiques globales, en clinique comme dans les modèles animaux (IV.1 c) α), une phase lésionnelle aiguë (24 premières heures), une phase subaiguë s'étendant à la fin de la première semaine où prédominent précisément les phénomènes apoptotiques, puis une phase chronique (Guglielmo et al., 1998). Le rôle éventuel des mécanismes inflammatoires et notamment de l'implication précoce des cellules phagocytaires à la phase aiguë d'une ischémie globale est l'objet d'étude de la 2^{ème} partie cette introduction.

III) ASPECTS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE L'ISCHEMIE CEREBRALE

III.1) Ischémie cérébrale et débit sanguin cérébral

A l'exception du cas particulier des ischémies anoxiques et anémiques, l'ischémie cérébrale résulte de la réduction ou de l'abolition du débit sanguin cérébral (DSC), entraînant une diminution des apports en oxygène et en glucose et une accumulation des métabolites cérébraux (Powers et al., 1984).

Le débit sanguin cérébral normal chez l'homme est en moyenne de 50 ml pour 100 g de tissu cérébral. Des études chez le Babouin et le Chat ont permis d'établir l'existence de seuils d'ischémie (Astrup et al., 1981) (Heiss, 1983). La suppression de la perfusion cérébrale induit en quelques secondes l'arrêt de l'activité électrique neuronale. Une réduction de 50 % du DSC entraîne une réduction de la synthèse protéique. A 40% du DSC normal, apparaît une glycolyse anaérobie avec production de lactate, réduction de la production d'ATP, et apparition d'une acidose ainsi que d'une libération de neurotransmetteurs (glutamate). Entre 30 et 40% de la valeur normale de DSC, l'activité électrophysiologique est compromise. Aux alentours de 30% (*seuil de défaillance électrique*), les neurones sont électriquement silencieux mais maintiennent une activité cellulaire basale. En cas de restauration d'un DSC normal, les neurones récupèrent et assurent de nouveau leur activité électrique. **Cette restitution potentielle des fonctions fonde le concept de pénombre ischémique** (Baron et al., 1981)

Le *seuil de défaillance membranaire*, synonyme d'altérations cellulaires irréversibles, est atteint autour de 20% du DSC normal. Le fonctionnement des pompes à sodium est altéré par faillite de la production énergétique neuronale. Ce dysfonctionnement entraîne une augmentation du potassium extracellulaire et la pénétration intracellulaire de sodium, de calcium et de chlore, responsable d'un œdème intracellulaire et d'une activation d'enzymes protéolytiques. Ces phénomènes sont à l'origine de lésions irréversibles, responsables d'une mort neuronale et gliale. L'importance des altérations énergétiques et structurales est conditionnée par le degré, la durée, et la rapidité de l'installation de la réduction du DSC.

L'ensemble des travaux ayant étudié l'impact d'une réduction du DSC sur l'activité cérébrale a ainsi contribué à la définition du concept de pénombre (Astrup et al., 1981) (Heiss, 1983).

III. 2) Le concept de pénombre ischémique

III. 2. a) Le concept originel

La pénombre ischémique est actuellement définie comme une zone fonctionnelle, constituant une cible pour les agents thérapeutiques destinés à la reperfusion et/ou la neuroprotection (Heiss, 2000). Ce terme désigne donc schématiquement une région à risque d'infarctus cérébral. Le devenir de cette zone est imprévisible et dépend avant tout de la restauration précoce de la perfusion cérébrale, limitant ainsi les conséquences du processus ischémique (dommages oxydatifs, inflammation, apoptose etc). L'évolution de la pénombre est influencée par différents facteurs : site de l'occlusion artérielle, rôle de la circulation collatérale, tolérance à l'ischémie du tissu cérébral (substance blanche versus substance grise). Celle-ci est variable d'un individu à l'autre et d'une région à l'autre, en raison de facteurs génétiques, du niveau d'expression des gènes impliqués dans l'ischémie cérébrale, etc.

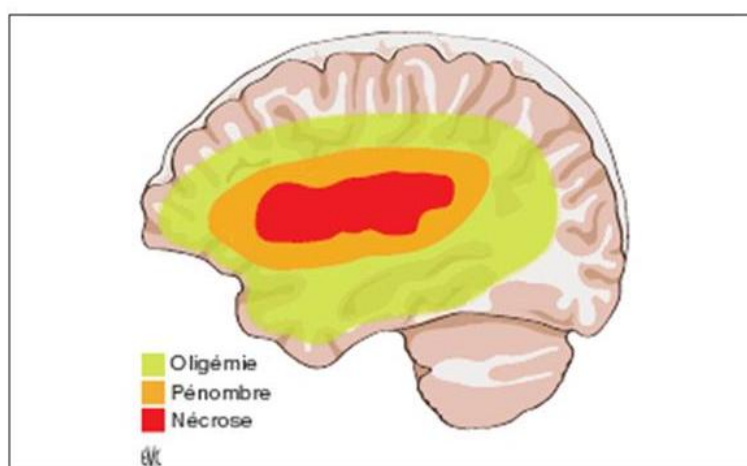


Figure 7: Représentation schématique de la pénombre ischémique
Le concept physiopathologique fondamental repose sur la distinction de trois compartiments au sein du tissu cérébral hypoperfusé : la zone infarctée (core); la zone qui va a priori survivre (oligémie) ; la zone de pénombre qui peut survivre ou être recrutée dans l'infarctus. D'après T.-H. Cho, J.-B. Pialat et al. *EMC Neurologie* 2009

Cette définition schématique de la zone à risque se heurte à la complexité des moyens utilisés pour évaluer l'hémodynamique et le métabolisme cérébral, aussi bien en clinique que dans les modèles expérimentaux. Au cours de ces 20 dernières années, la tomographie à émission de positons et l'imagerie par résonance magnétique ont contribué à identifier la pénombre ischémique. Cependant, les résultats obtenus par ces différentes méthodes sont encore

débat et n'ont pas permis de retrouver les seuils d'ischémie correspondant à la définition originale, issue des données expérimentales.

III. 2. b) Les méthodes d'évaluation de la pénombre ischémique

III. 2. b. α) La tomographie à émission de positons (TEP)

La TEP est théoriquement l'outil le plus pertinent pour étudier la pénombre ischémique. La TEP autorise une approche quantitative absolue des paramètres hémodynamiques et métaboliques (débit sanguin cérébral, consommation d'oxygène, taux extraction d'oxygène) au sein de la zone d'infarctus et en périphérie. La pénombre ischémique implique (Baron, 2001a; Baron, 2001b) : 1) le maintien d'un débit entre 17 et 22 ml/100g/min, 2) une préservation de la consommation d'oxygène et 3) un accroissement des capacités d'extraction de l'oxygène. Le marquage spécifique des récepteurs aux benzodiazépines est venu compléter l'arsenal des méthodes TEP destinées à l'exploration de la viabilité tissulaire. L'utilisation de ligands tel que le flumazenil marqué au carbone 11 (FMZ) a permis de montrer que le défaut de captation témoignait de dommages cellulaires irréversibles en relation avec une chute critique du débit sanguin cérébral et de la consommation d'oxygène (Heiss et al., 2001). Une méthode de représentation tridimensionnelle de la pénombre ou « penumbragrams » à l'aide du 18-F-fluoromisonidazole (FMISO) a récemment été validée. Cette approche autorise une représentation optimale de la pénombre (Markus et al., 2004). Le nombre limité des structures TEP, le coût et la durée de ces explorations, l'irradiation, la nécessité d'un cathétérisme artériel, l'absence de données immédiates, destinent cet examen avant tout à la compréhension de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et non pas à la décision thérapeutique en urgence.

III. 2. b. β) L'imagerie en résonance magnétique (IRM) : Les séquences de perfusion et de diffusion

Au cours de ces dix dernières années, l'IRM multimodale qui associe notamment les séquences de diffusion et de perfusion a tenté d'appréhender le profil bioénergétique et hémodynamique de l'accident ischémique cérébral (Baird and Warach, 1998; Schlaug et al., 1999) (Baird et al., 1997; Jansen et al., 1999) (Kidwell et al., 2002) (Darby et al., 1999). L'évaluation de la perfusion en IRM repose sur la dynamique de premier passage d'un agent de contraste paramagnétique dans le secteur vasculaire. Les séquences de diffusion objectivent précocement les dommages tissulaires. Les anomalies observées en diffusion sont en rapport avec l'œdème cytotoxique. L'œdème intracellulaire associé à une diminution de

l'espace extracellulaire expliquerait en effet la diminution du coefficient apparent de diffusion (ADC), lié à la réduction des mouvements de l'eau libre induite par les modifications des compartiments intra et extra-cellulaires.

La disponibilité en urgence de cette méthode d'imagerie autorise une approche pragmatique et précoce de la zone à risque. Le concept de *mismatch* fondé sur la soustraction des volumes de perfusion et de diffusion est apparu comme un moyen simple permettant d'identifier en urgence la zone à risque (Baird and Warach, 1998; Schlaug et al., 1999). Schématiquement, la zone de nécrose est assimilée au volume lésionnel objectivé par les séquences de diffusion. En l'absence d'une reperfusion rapide, les études séquentielles ont montré une extension de la lésion initiale au dépend de la zone hypoperfusée (Baird et al., 1997) (Jansen et al., 1999).

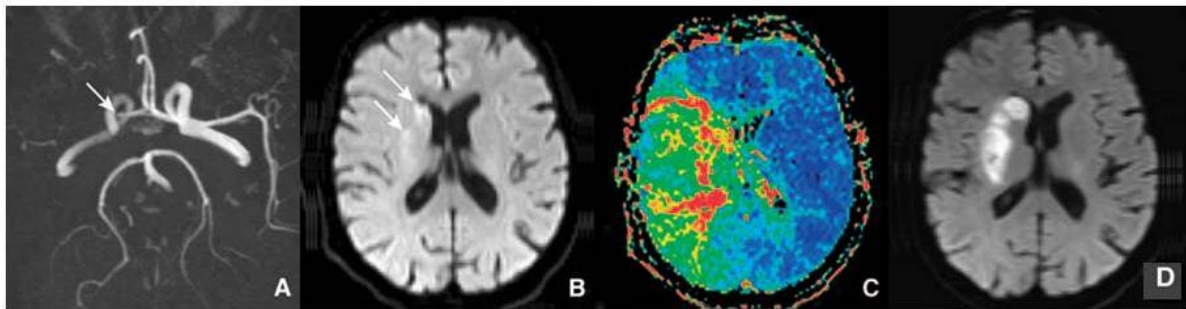


Figure 8: Mismatch

Imagerie par résonance magnétique (IRM) au cours d'une occlusion proximale de l'artère cérébrale moyenne droite (A) effectuée à 2 h 30 du début des symptômes montrant en diffusion un hypersignal limité lenticulaire et caudé droit (B) et un allongement du temps d'arrivée du pic (TTP) dans l'ensemble du territoire sylvien droit (C) : aspect de mismatch étendu.

IRM à J2 révélant une extension modérée des lésions en diffusion dans le territoire lenticulostré et une épargne du territoire sylvien superficiel (D).

D'après T.-H. Cho, J.-B. Pialat, N. Nighoghossian. EMC Neurologie 2009

Ce concept de mismatch fait actuellement l'objet d'une révision critique (Kidwell et al., 2002). A la différence de la TEP, l'IRM de perfusion n'autorise pas à ce jour une évaluation quantitative absolue de l'hémodynamique cérébrale. Les principaux paramètres utilisés (TTP : time to peak, MTT : temps de transit moyen, DSC : débit sanguin cérébral, VSC : volume sanguin cérébral) ne donnent qu'une information hémodynamique semi-quantitative, la plupart du temps rapporté aux valeurs de l'hémisphère contralatéral. Quand aux lésions détectées par l'imagerie de diffusion, elles ne correspondent pas nécessairement à la nécrose. Les études IRM longitudinales ont montré que près de 30 à 50% du volume lésionnel initial observé en imagerie de diffusion était réversible, ceci en présence ou non d'une recanalisation. Par ailleurs, les différentes tentatives visant à établir des seuils de viabilité tissulaire à l'aide des paramètres IRM n'ont pas permis de définir précisément la zone à

risque. Aucun consensus n'est établi sur le choix des paramètres hémodynamiques et la pertinence des critères définissant la zone de *mismatch*. Pour répondre à cette carence, de nombreux programmes de modélisation multiparamétriques de la souffrance tissulaire sont en cours d'élaboration. L'objectif de ces modélisations est de faire de l'IRM un meilleur outil d'évaluation thérapeutique. L'adjonction de séquences complémentaires, explorant le métabolisme (spectroscopie, détermination de la consommation régionale d'oxygène : CMRO2 par effet BOLD) permettrait de compléter de manière pertinente l'évaluation du tissu à risque, sous réserve de ne pas allonger la durée d'examen.

En pratique, la présence initiale d'une zone à risque en IRM prédit une meilleure évolution clinique si une recanalisation est obtenue précocement. L'absence de *mismatch*, si elle ne constitue pas un critère d'exclusion thérapeutique, est généralement assortie d'un pronostic plus péjoratif, même si la recanalisation est obtenue. Cette zone à risque est encore présente chez 45% des patients imagés entre 18 et 24 heures (Darby et al., 1999). Cette constatation pourrait modifier l'approche thérapeutique classique : à la fenêtre horaire pourrait se substituer une fenêtre tissulaire.

III. 2. b. γ) Pénombre ischémique, la discordance TEP et IRM...

La confrontation des méthodes TEP et IRM, à la phase aiguë des accidents ischémiques a limité les prétentions du mismatch IRM comme moyen d'identification exclusif de la zone à risque. Guadagno et al (Guadagno et al., 2004) ont montré que la lésion imagée en IRM de diffusion pouvait être partiellement le siège d'une pénombre ischémique, selon les seuils définis en TEP. En outre, les zones caractérisées par un bas coefficient d'ADC étaient retrouvées, aussi bien dans la zone de diffusion que dans la zone de pénombre objectivée en TEP. Une étude confrontant les deux méthodes a montré que la zone de mismatch était compatible avec les critères de pénombre définis en TEP chez seulement 60% des patients (Sobesky et al., 2005). Ces études couplant les méthodes PET et IRM ont été complétées par l'évaluation de la viabilité tissulaire à l'aide de ligands marquant les récepteurs aux benzodiazépines. Des divergences significatives ont été observées. La présence d'une anomalie en IRM de diffusion n'est pas corrélée à une perte neuronale identifiée par une absence de liaison des ligands aux récepteurs (Heiss et al., 2004). Plus récemment, Shimosegawa et al (Shimosegawa et al., 2005) couplant TEP et IRM ont montré que l'extension de la lésion ischémique au sein de la zone de mismatch était précédée d'une réduction de la consommation d'oxygène au cours des six premières heures sans réduction du

coefficient d'ADC. Cette dissociation entre ADC et consommation d'oxygène indique que le coefficient d'ADC ne peut constituer une variable prédictive de la viabilité tissulaire.

III. 2. b. δ) Perspectives

En somme, la définition de la pénombre dépend des outils utilisés. Or, l'identification d'une zone à risque est un argument plaçant pour une action thérapeutique énergique. En dépit des controverses, l'IRM demeure à ce jour la méthode d'imagerie la plus pragmatique.

La constatation des limites des moyens actuels d'évaluation de la pénombre incite au développement de nouveaux biomarqueurs caractérisant la pénombre. Dans ce contexte, l'IRM cellulaire et moléculaire devrait permettre d'identifier à terme de nouvelles cibles biologiques : recrutement et activation cellulaire, synthèses protéiques, production de cytokines, activation enzymatique etc. Le développement de ces nouveaux outils pourrait permettre d'appréhender les mécanismes biologiques propres à la situation de pénombre et d'adapter les stratégies de prise en charge de l'accident ischémique, au-delà des moyens destinés à la correction des désordres hémodynamiques. ***C'est dans cette perspective que s'inscrit ce travail de thèse qui s'est intéressé en particulier à l'activation phagocytaire aux stades précoces post-ischémie et à la validation d'une technique d'IRM avec produit de contraste ciblant les cellules phagocytaires.*** En effet, l'identification d'autres aspects de la pénombre, notamment ceux liés à l'inflammation, à l'aide de l'imagerie cellulaire et moléculaire, est de nature à étendre le champ d'action thérapeutique afin d'éviter l'évolution vers des lésions ischémiques constituées caractérisées par une mort neuronale décrite ci-après (III) 3)).

La notion fondamentale introduite avec ce concept de pénombre est celle d'une hétérogénéité au sein du territoire ischémié. Cette hétérogénéité visible déjà " macroscopiquement " par l'imagerie est présente à l'échelle histologique et découle d'une hétérogénéité du degré d'hypoxie au sein du territoire ischémié, mais également de la réponse tissulaire à cette ischémie. Cette réponse locale est réalisée à l'échelle tissulaire par les composants de l'unité neurovasculaire (cellules endothéliales, pieds astrocytaires et neurones), régulant dynamiquement la microvascularisation cérébrale (del Zoppo and Mabuchi, 2003). La prise en compte de cette hétérogénéité a par ailleurs conduit à développer des modèles d'ischémie déclinant une gamme d'hypoxie d'intensité variable et mettant en jeu des mécanismes

différents, donc responsables de lésions ischémiques hétérogènes (Kaushal and Schlichter, 2008) (Lobysheva et al., 2009). La production d'une pénombre expérimentale est en effet un enjeu majeur de la modélisation de l'ischémie. (cf Introduction 1^{ère} partie IV).

III. 3) Effets de l'ischémie sur les neurones

III. 3. a) La perte neuronale

On estime que lors d'AVC territorial, sus-tentorial typique, 120 millions de neurones, 830 billions de synapses et 714 km de fibres myélinisées sont perdus par heure. L'AVC standard, dont la durée est estimée à 10 heures, est donc responsable d'une perte tissulaire équivalente à 36 ans de perte neuronale physiologique (Saver, 2006). Ces chiffres ont été calculés à partir d'une relecture systématique des mesures quantitatives de la perte cérébrale post-AVC obtenus par imagerie et morphométrie. La constatation de cette perte neuronale massive au fil des heures ischémiques a fait émerger le leitmotiv de "*time is brain*" qui régit actuellement la prise en charge thérapeutique en urgence de l'AVC ischémique.

De façon assez logique, la plupart des travaux sur l'ischémie cérébrale se sont dès lors concentrés sur cette perte neuronale induite par l'ischémie et les mécanismes neuroprotecteurs éventuellement mis en jeu dans la survie neuronale. Ce n'est que plus récemment que des équipes se sont penchées sur les modifications des connections neuronales et les changements morphologiques synaptiques et leurs impacts potentiels sur le fonctionnement et la survie neuronale.

III. 3. b) Les mécanismes de mort neuronale : nécrose et apoptose

La perte neuronale consécutive à l'ischémie est la résultante de nombreux mécanismes intriqués et évolutifs dans le temps et dans l'espace (Deplanque, 2003). Le cœur de l'ischémie, c'est-à-dire la zone de tissu cérébral où la diminution du débit sanguin et la privation énergétique sont les plus précoces et les plus sévères, est le siège d'une nécrose tissulaire. Cette forme particulière de mort cellulaire, aux caractéristiques anatomopathologiques spécifiques (gonflement des organites intracellulaires et du cytoplasme, lyse osmotique, extrusion du contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire (Majno and Joris, 1995)), se développe rapidement au cours de l'ischémie. Cette mort neuronale met en jeu des processus pathologiques cytoplasmiques liés notamment à

l'excitotoxicité médiée par le calcium et le glutamate et aux phénomènes de dépolarisation péri-infarctus (Hossmann, 1996) (Kristian and Siesjo, 1998).

Au sein de la zone dite de pénombre où persiste un certain degré de perfusion du tissu cérébral, la mort neuronale résulte principalement d'un programme cellulaire particulier, l'apoptose (Strong and Planas, 2007). Ce type de mort cellulaire se différencie de la nécrose par ses aspects anatomopathologiques (condensation de la chromatine, fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN), convolution des membranes cytoplasmique et nucléaire, rétraction cellulaire) ainsi que par son mode de développement (Graham and Chen, 2001).

L'évolution préférentielle vers la nécrose ou l'apoptose dépend de la nature et de l'intensité du stimulus (activation des récepteurs du glutamate, surcharge en calcium, radicaux libres, NO, lésions de la mitochondrie, inflammation...). Une étude *in vitro* a ainsi récemment mis en évidence l'importance de la distribution de glucose et d'oxygène et de son hétérogénéité au sein de la zone ischémisée dans le "choix" du programme de mort cellulaire (Lobysheva et al., 2009). Il existe par ailleurs des arguments pour une activation très précoce de l'apoptose au cœur de l'ischémie par des voies indépendantes de la mitochondrie (Benchoua et al., 2001). Le déterminisme de l'évolution vers l'une ou l'autre des modalités de mort neuronale est donc complexe (Lipton, 1999) et n'est que partiellement élucidé (Dereski et al., 1993).

III. 3. c) Ischémie et modifications synaptiques

Toutes les lésions ischémiques ne sont pas forcément synonymes de mort neuronale immédiate. Lorsque l'ischémie est transitoire, elle peut être responsable d'une mort neuronale différée ou d'une plasticité neuronale, notamment en périphérie de la lésion ischémique (Briones et al., 2005). Une neuroplasticité, par colatéralisation ("sprouting") des prolongements axonaux et remodelage synaptique a été décrite dans des hippocampes ischémisés (Schmidt-Kastner and Freund, 1991) (Jourdain et al., 2002) (Nikonenko et al., 2003).

La composition moléculaire et ultrastructurale des densités post-synaptiques, visibles en microscopie électronique sous la forme d'un épaississement de la membrane du neurone postsynaptique en regard d'une terminaison axonale, est modifiée à la suite d'épisodes ischémiques. Ces régions membranaires post-synaptiques sont le siège d'une concentration de systèmes de réception et de canaux ioniques fortement impliqués dans la transmission synaptique (Hu et al., 1998). La proportion des différents types synaptiques s'est avérée être également altérée de façon dynamique au cours d'une ischémie modélisée *in vitro* (Jourdain et

al., 2002). Ces altérations synaptiques post-ischémiques n'épargnent pas l'ultrastructure des terminaisons pré-synaptiques (Jourdain et al., 2002) (Nikonenko et al., 2003) (Briones et al., 2005). Ces modifications synaptiques ont été mises en évidence très précocement après l'ischémie, à la fois in vitro et in vivo (Kovalenko et al., 2006), avant même que ne soit visible une dégénérescence neuronale. Ces altérations structurelles précoces pourraient être impliquées dans des mécanismes conduisant à la mort neuronale mais aussi dans des processus de neuroplasticité post-ischémique (Kriz and Lalancette-Hebert, 2009) (Brown et al., 2008) (Winship and Murphy, 2008).

Ces derniers processus de neuroplasticité, qui conditionnent certainement à terme la récupération fonctionnelle, apparaissent étroitement liés aux mécanismes neuroinflammatoires (Hanisch and Kettenmann, 2007; Kriz and Lalancette-Hebert, 2009), qui seront abordés dans la 2^{ème} partie de cette introduction. En effet, les médiateurs moléculaires de la réaction inflammatoire post-ischémique sont notoirement connues comme régulateurs du fonctionnement synaptique (Dirnagl et al., 1999) (Iadecola, 1997) (Vilcek and Feldmann, 2004). Par ailleurs, le rôle crucial du principal effecteur de la réponse inflammatoire cellulaire qu'est la cellule microgliale a déjà été mis en évidence dans les mécanismes de neuroplasticité mis en jeu au cours du développement cérébral (Waxselman et al., 2008).

IV) LES MODELES EXPERIMENTAUX D'ISCHEMIE

IV. 1) Les modèles in vivo :

IV. 1. a) Les principes généraux et "historiques"

IV. 1. a. α) La recherche d'un anthropomorphisme anatomique

Le choix de l'espèce animale du modèle ischémique est naturellement guidé par la recherche d'un anthropomorphisme dans l'anatomie vasculaire. Selon ce principe, les primates non humains représenteraient bien sûr des modèles privilégiés. En effet, ils partagent avec l'espèce humaine des similitudes non seulement sur le plan de l'anatomie cérébrovasculaire mais aussi sur le plan de l'intégration sensori-motrice au sein d'un "cerveau gyré" (versus lissencéphalique chez les rongeurs). Pourtant, les études expérimentales sur l'ischémie cérébrale sont très majoritairement réalisées dans des modèles murins pour des raisons évidentes de coût et d'acceptabilité éthique.

La sélection d'une espèce murine repose sur le principe, promulgué en 1927 par Shellshear (Shellshear, 1927a) (Shellshear, 1927b) et implicitement admis depuis, selon lequel les schémas anatomiques exprimés précocement dans la phylogénie sont conservés dans les espèces situées plus haut dans la hiérarchie phylogénétique.

Le deuxième principe essentiel pour la crédibilité du modèle animal est la supposée interdépendance des variables physiologiques, biochimiques et anatomiques. En pratique, l'espèce est sélectionnée sur des critères morphologiques. A contrario, les espèces dont l'anatomie vasculaire diverge anatomiquement de la vascularisation humaine sont naturellement écartées.

C'est ainsi que le Rat est l'espèce qui a été la plus largement utilisée dans les modèles d'ischémie pour plusieurs raisons : la ressemblance de son anatomie et de sa physiologie cérébrovasculaire avec l'espèce humaine (Macrae, 1992), sa taille intermédiaire permettant un contrôle des paramètres physiologiques au cours de l'ischémie et une analyse histologique du cerveau ischémié (Takizawa et al., 1991), et enfin, la bonne homogénéité au sein des souches offrant la possibilité de conduire aisément des études reproductibles (Brinker et al., 1999). Le Rat s'est ainsi avéré un excellent candidat pour modéliser la maladie cérébrovasculaire humaine (Tamura et al., 1981) (Macrae, 1992). Au sein de l'espèce, certaines souches sont apparues néanmoins plus ou moins sensibles à l'ischémie. Cette susceptibilité variable va se traduire par des tailles lésionnelles différentes par exemple dans le même modèle d'occlusion artérielle ou bien encore par une dynamique d'évolution des lésions de la pénombre à la nécrose variable d'une souche à l'autre (Bardutzky et al., 2005). Une souche est particulièrement susceptible aux accidents vasculaires : il s'agit de la souche spontanément hypertendue qui développe de manière reproductible des infarctus étendus suite à une occlusion artérielle cérébrale et ceci indépendamment des chiffres tensionnels, (Coyle, 1986) (Duverger and MacKenzie, 1988) (Nabika et al., 2004). Cette souche non génétiquement modifiée apparaît comme un bon modèle d'étude de la susceptibilité génétique à l'ischémie cérébrale.

Actuellement, l'essor de la transgénèse chez la Souris, offrant la possibilité d'étudier au niveau moléculaire les mécanismes physiopathologiques, a justifié le développement de modèles d'ischémie dans cette autre espèce murine.

IV. 1. a. β) La recherche d'un anthropomorphisme pathologique

La maladie cérébrovasculaire (notamment l'artériosclérose) n'est pas l'apanage de l'espèce humaine. Cependant les accidents vasculaires cérébraux spontanés sont rares chez l'animal "sauvage" à l'exception du cochon âgé. Des travaux exhaustifs de neuropathologie cérébrovasculaire comparative ont permis d'étayer l'hypothèse selon laquelle les méthodes expérimentales induisant des lésions macroscopiquement et microscopiquement caractéristiques des infarctus cliniques, étaient également à l'origine d'altérations biochimiques et physiologiques reproduisant la pathogénie ischémique humaine (Frankhauser, 1965).

Ces méthodes d'induction des lésions ischémiques sont classiquement classées selon la distribution et l'étiologie des processus ischémiques (**IV. 1. a) γ**)).

Dans la pathologie humaine, la maladie cérébro-vasculaire ischémique est beaucoup plus fréquente chez le sujet âgé. Dans un souci d'anthropomorphisme " pathologique ", plusieurs équipes ont cherché à mettre en évidence une augmentation de la taille des lésions ischémiques avec l'âge dans différents modèles d'AVC. Les résultats sont divergents. Duverger and Mackenzie (Duverger and MacKenzie, 1988), ainsi que Wang et al. 2003 (Wang et al., 2003), n'ont pas montré de corrélation entre l'âge des animaux et la taille lésionnelle. Selon Davis et al (Davis et al., 1995), les rats âgés seraient susceptibles de faire des lésions plus étendues alors que Shapira et al. (Shapira et al., 2002) décrivent une corrélation inverse. Si la question de l'influence directe de l'âge sur la taille lésionnelle n'est pas clairement tranchée, le pronostic neurologique fonctionnel post-ischémique est moins bon chez les rats âgés (Zhang et al., 2005). En pratique, la plupart des modèles d'ischémie sont réalisés sur des animaux jeunes pour des raisons de coût d'élevage, et pour limiter les pathologies chroniques intercurrentes qui pourraient influencer le décours ischémique.

L'autre critère à prendre en compte dans une perspective "anthromorphique" est la susceptibilité liée au sexe. En effet, chez l'Homme, la pathologie cérébrovasculaire est beaucoup plus rare chez les sujets de sexe féminin avant la ménopause. Les études chez l'animal ont retrouvé ce déséquilibre lié au sexe. Dans un modèle d'AVC chez le Rat, les femelles développent des lésions ischémiques plus petites et cette différence de taille lésionnelle en fonction du sexe disparaît en cas d'ovariectomie précoce (Alkayed 1998). Là encore, en pratique, la plupart des études expérimentales sont réalisées sur des mâles.

IV. 1. a. γ) La classification historique des modèles

D'après (Molinari, 1976)

Il existe deux grandes approches pour interrompre la circulation sanguine cérébrale :

La compression artérielle extravasculaire par ligation/clampage externe

La modulation hémodynamique intravasculaire par embolisation ou hypotension

En 1976, suite à plusieurs symposium sur les modèles expérimentaux d'AVC, Molinari et al. ont proposé une classification des modèles mettant en parallèle les contreparties cliniques.

Distribution of Ischemia	Etiology of Ischemia			
	Extravascular		Intravascular	
Global	Brachiocephalic A. Ligation, Cervical Compression (+)		Hypotension, (+) Cardiac Asystole (+)	
Hemispherical	Int. Carotid A Ligation (+) with- Incomplete, or Attenuated Anastomotic Circle		Intracarotid Perfusion with- Wax, Polyvinyl Acetate	
Multifocal			Embolism with- Microspheres, Autologous Blood Clot (+)	
Focal	Point	Segmental	Point	Segmental
	Single Clip (+)	Multiple Clips, (+) Electro- cautery, (+) Vasospasm (+)	Spherical Embolus (Ball Bearing)	"Fogarty" Catheter, Elastic Cylinder Embolism (+)

(+) = Clinical Counterpart in Man

Tableau 1: La classification historique des modèles
d'après Molinari et al. 1976

L'inconvénient principal des méthodes "extravasculaires" de clampage/ligation était représenté par les lésions de l'innervation autonome vasculaire, potentiellement responsable d'artefacts neurogéniques. Par ailleurs, les compressions des artères distales nécessitaient une craniectomie, pourvoyeuse de lésions collatérales potentielles. Cet inconvénient venait modérer l'avantage offert par la possibilité d'un contrôle visuel précis du site de l'occlusion vasculaire.

A l'époque, le grand avantage de ces modèles "extravasculaires" était de permettre la réalisation d'ischémies transitoires, qui n'étaient pas possibles par les méthodes "historiques" intravasculaires. Depuis le développement du modèle d'occlusion transitoire par fil

intraluminal (cf IV.1.c. β iii), cet avantage a disparu. Actuellement, les méthodes "extravasculaires" sont encore utilisées pour la réalisation d'ischémie globale ou hémisphérique notamment par occlusion transitoire bicarotidienne.

IV. 1. b) Des facteurs de variabilité et mortalité communs à tous les modèles d'ischémie :

IV. 1. b. α) Les modalités d'anesthésie

De manière générale, tous les modèles d'ischémie cérébrale (globale ou focale) sont réalisés sur des animaux anesthésiés. Or la plupart des anesthésiques couramment utilisés en expérimentation animale ont des propriétés neuroprotectrices (Kirsch et al., 1996). C'est notamment le cas de la kétamine, très couramment utilisée car offrant l'avantage d'une analgésie post-opératoire. Ces propriétés neuroprotectrices sont prises en compte dans le choix des analgésiques utilisés notamment dans les études précliniques de molécule à visée neuroprotectrice. Les modalités d'administration des anesthésiant sont également déterminantes pour le contrôle des paramètres hémodynamiques et donc le déroulé de l'ischémie. Ainsi, si les injections intrapéritonéales de xylazine/kétamine ou chlorhydrate sont de réalisation aisée et offrent les avantages d'une analgésie et anesthésie stable et durable, elles ne permettent pas le contrôle ventilatoire pourtant si déterminant sur les paramètres ischémiques. En général, des anesthésies gazeuses sont réalisées en respiration spontanée, par l'inhalation d'un mélange d'oxygène et d'halogénés (isoflurane ou halothane). Le pourcentage d'anesthésiant gazeux du mélange inhalé par masque est en général adapté à la fréquence respiratoire de l'animal ou mieux à la mesure de pression partielle artérielle en O₂. L'anesthésie gazeuse sur animal intubé et ventilé est la procédure permettant bien sûr le meilleur contrôle des paramètres hémodynamiques et donc une diminution de la variabilité et de la mortalité post-ischémie (Murakami et al., 1998). Il s'agit néanmoins d'une procédure expérimentale lourde et coûteuse, finalement peu utilisée, y compris dans les modèles d'ischémie focale et chez le Rat (Zausinger et al., 2002).

IV. 1. b. β) La température

L'hypothermie comme l'hyperthermie sont susceptibles d'affecter la taille lésionnelle. L'effet neuroprotecteur d'une hypothermie modérée (33°C) a clairement été démontré à la fois dans des modèles d'ischémie focale (Barone et al., 1997b) (Ginsberg et al., 1992) mais aussi globale (Chopp et al., 1989) (Busto et al., 1989). Cette neuroprotection liée à une diminution

de la température centrale au cours de l'ischémie apparaît secondaire à une réduction de l'activité métabolique (Lanier, 1995) et une diminution de la transmission glutamatergique (Hammer and Krieger, 2003; Nakashima and Todd, 1996). Tsuchiya et al. (Tsuchiya et al., 2002) ont notamment montré que cette neuroprotection par l'hypothermie était liée à une réduction de la translocation du zinc dans les neurones post-synaptiques aboutissant à une baisse de la perte neuronale hippocampique. Au contraire, une hyperthermie, même modérée, aggrave les lésions ischémiques (Krieger and Yenari, 2004) (McIlvoy, 2005). Ainsi, la température apparaît comme un paramètre à contrôler de façon très rigoureuse dans tout modèle d'ischémie et dans tout essai thérapeutique à visée neuroprotectrice (Nagel, 2008 #34). Il s'agit par ailleurs d'une piste thérapeutique en soi prometteuse et actuellement en cours d'application clinique (Hartemink et al., 2004) (Meloni et al., 2009).

IV.1.c) Les modèles actuels

IV.1.c.α) Le modèle d'occlusion bicarotidienne (BCAO) :

Modèle d'ischémie globale

IV.1.c.α) i) La perméabilité du polygone de Willis

Facteur essentiel de variabilité inter-espèce et inter-individuelle

Le moyen le plus évident pour provoquer une ischémie globale hémisphérique et d'interrompre la circulation carotidienne de façon bilatérale. Néanmoins, cette interruption ne générera une ischémie qu'en l'absence de compensation par un afflux de sang issu de la circulation vertébro-basilaire via le polygone de Willis (cf **II. 2. a. γ**) et **Figure 2** : vascularisation). Hors, cette anastomose salvatrice existe chez le rongeur comme chez l'homme chez qui elle est fréquemment mise en jeu pour compenser notamment les sténoses serrées et occlusions carotidiennes athéromateuses. Au sein du polygone, l'artère communicante postérieure (PCoMA) est la portion cruciale pour qu'une suppléance de perfusion dans le territoire carotidien puisse se mettre en place à partir de la circulation postérieure (**Figure 9** d'après Kitagawa et al. (Kitagawa et al., 1998)). La PCoMA est absente chez la Gerbille et au contraire constante chez le Rat. On comprend naturellement que les modèles d'ischémie globale par BCAO ont été essentiellement développés chez la Gerbille (Levine and Sohn, 1969) (Berry et al., 1975; Kahn, 1972), alors que les modèles d'ischémie globale développés chez le Rat nécessitent eux l'interruption de 3 (BCAO et ligation

basilaire) (Kameyama et al., 1985) ou 4 (BCAO et ligation des 2 vertébrales) artères à destinée céphalique (Pulsinelli et al., 1982) ou l'association d'une hypotension artérielle par hémorragie à l'occlusion bicarotidienne (Hartman et al., 2005). Chez la Souris, espèce potentiellement source d'animaux transgéniques, la présence de cette anastomose est extrêmement variable d'une souche à l'autre et entre individus d'une même souche (cf Figure 9) {Barone, 1993 #292) (Yang et al., 1997). La souche de souris C57Bl6 a été très couramment utilisée dans les modèles de BCAO car elle présente un faible degré d'anastomose entre la circulation carotidienne et vertébrobasilaire au niveau du cercle de Willis et donc une forte susceptibilité à des lésions d'ischémie hémisphériques suite à une occlusion carotidienne bilatérale. Chez les souris transgéniques, la perméabilité de la PComA dépend de la souche génétiquement modifiée. Il s'agit le plus souvent d'un "fond" C57Bl6 ou SV129 dont va dépendre la susceptibilité à l'ischémie de la lignée transgénique (Fujii et al., 1997).

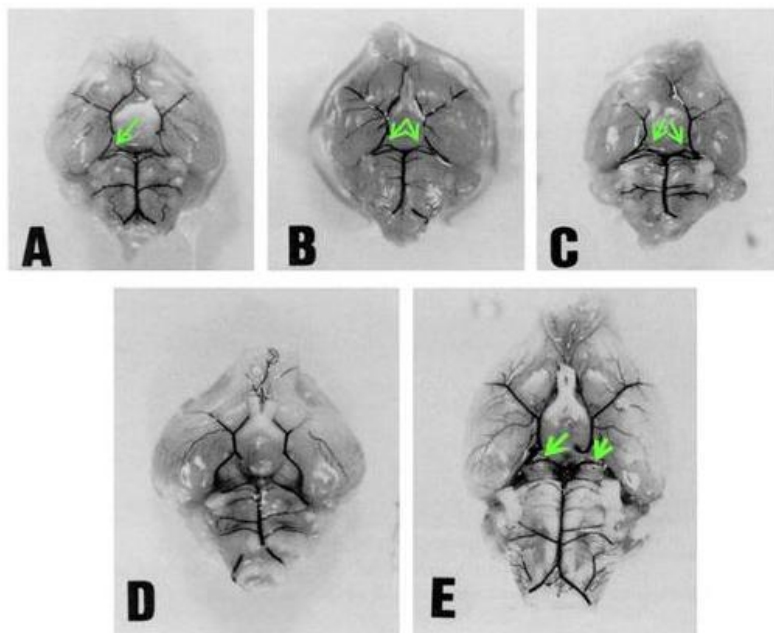


Figure 9 : Variabilité de l'artère communicante postérieure (PComA) d'après Kitagawa et al. 1998.

A-C: souris (C57/Bl6, CBA, DBA/2), D: gerbille, E : rat

PComA: fléchée quand présente

A l'échelle individuelle, la corrélation entre la perméabilité de la PComA, l'hypoperfusion cérébrale hémisphérique objectivée par mesure doppler-laser de la microperfusion corticale et les lésions ischémiques finales notamment hippocampiques et striatales, a clairement été

démontrée (Kitagawa et al., 1998; Murakami et al., 1998). Ces lésions sont en général bilatérales et asymétriques et il ne semble pas exister actuellement de moyen de prédire le côté le plus atteint (Kitagawa et al., 1998; Tsuchiya et al., 2002). Pour réduire la variabilité interindividuelle, dépendante de la perméabilité du polygone, certaines équipes ont développé des modèles associant au BCAO des ligations concomitantes des artères sous-clavières (Hua et al., 2006). Ces modèles nécessitent une intubation/ventilation des animaux pour réduire le taux de mortalité qui diminue à 10% sous contrôle de la ventilation.

IV.1.c. a) ii) Une vulnérabilité sélective au sein de l'hippocampe.

La plupart des travaux ont constaté une vulnérabilité sélective des différentes régions hippocampiques et du striatum sans l'expliquer clairement.

Cette sélectivité varie selon les études et les espèces même si l'atteinte du CA1 est constante et souvent prédominante. Ainsi, Cho et al (Cho et al., 2006; Cho et al., 2007a), dans un modèle de BCAO de 30 minutes chez la souris adulte C57Bl6 ont mis en évidence, 72 heures après l'ischémie, une atteinte prédominante dans les couches CA1, 2 et 4, et épargnant le CA3. Tsuchiya et al.(Tsuchiya et al., 2002) chez la souris CD1 ont eux montrés à 72h post-BCAO de 20 min une atteinte préférentielle du CA2. Il semble par ailleurs exister aussi une sélectivité régionale de l'éventuel effet neuroprotecteur de molécule anti-inflammatoire, comme la minocycline, qui ne préserve de l'ischémie que les neurones du CA1 et du striatum selon Cho et al. (Cho et al., 2007a). Cette sélectivité régionale de la réponse à un anti-inflammatoire suggère que des mécanismes inflammatoires différents pourraient expliquer la topographie sélective des lésions ischémiques hippocampiques.

IV.1.c. a) iii) La durée de l'ischémie transitoire : une variable modulable

Il existe une corrélation indiscutable entre la durée de l'occlusion bicarotidienne transitoire et non seulement l'intensité des lésions ischémiques hippocampiques mais également leur délai d'apparition (Murakami et al., 1998). En effet, les occlusions inférieures à 10 minutes sont en général responsables de l'apparition différée de lésions hippocampiques, évaluées en général entre 72 heures et 7 jours. Par exemple, Murakami et al. décrivent des lésions hippocampiques aiguës évidentes à 24h après 10 min d'occlusion, et des lésions différées, objectivées à 72h, lors d'une occlusion de 3 minutes. Cette influence de la durée est dépendante à l'échelle

individuelle de la perméabilité de la PcomA. La mortalité est également étroitement corrélée à la durée de l'occlusion et reste élevée au-delà de 10 minutes d'occlusion sans contrôle ventilatoire per-opératoire (60% de décès à 72h post-ischémie selon Murakami et al. (Murakami et al., 1998). En fait, les travaux dédiés à la mortalité du modèle employé sont rares.

En somme, les facteurs de variabilité aisément contrôlables, la durée de l'occlusion et la température, sont fixés par chaque équipe en fonction du type de lésions souhaité (limitée versus étendue, aiguës versus différées, nécrose versus apoptose), et du taux de mortalité " accepté ".

IV.1.c. β) Les modèles d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne :

Modèles d'AVC sylvien

D'après Durukan et al. (Durukan and Tatlisumak, 2007) (Durukan et al., 2008) pour revue

IV.1.c. β) i) La sélection du modèle d'AVC

La plupart des modèles animaux d'AVC produisent des lésions ischémiques dans le territoire de l'artère cérébrale moyenne afin d'être "cliniquement " pertinent, les AVC chez l'Homme siégeant majoritairement dans le territoire sylvien. Ces ischémies expérimentales sont soit permanentes soit transitoires, la taille finale des lésions variant alors avec la durée de l'ischémie. Pour obtenir des volumes d'infarctus reproductibles, la durée minimale d'ischémie est de 60 à 90 minutes (Durukan et al., 2008). Pour cette raison, dans les modèles dit transitoires, la durée d'ischémie varie entre 90 et 120 minutes. Au-delà de 3 heures, les lésions sont considérées comme irréversibles (Grotta, 1995).

Les modèles d'ischémie dite permanente permettent d'étudier les mécanismes ischémiques indépendamment des phénomènes liés à la reperfusion. Au contraire, les modèles d'ischémie dite transitoire permettent d'étudier les conséquences de la recanalisation de l'artère cérébrale occluse. Cette reperméabilisation après occlusion est très fréquemment constatée au cours des AVC cliniques. Ces modèles transitoires ont ainsi pu permettre de mettre en évidence des lésions imputables à la reperfusion, fréquemment suspectées et mises en cause en clinique (Aronowski et al., 1997),(Gursoy-Ozdemir et al., 2004).

Ainsi les différents modèles ont été développés pour approcher au plus près les différents aspects de l'AVC ischémique, en sachant que ce terme d'AVC recouvre une diversité de situations physiopathologiques. Il n'existe donc pas évidemment UN modèle unique d'AVC mais plusieurs, ayant comme principaux critères de qualité les réponses aux questions suivantes, d'après Li et Fisher (Li et al., 2001) :

1) Pertinence vis-à-vis de la situation clinique " modélisée ". Le modèle reproduit-il le type d'AVC étudié ?

- embolique versus thrombose sur plaque,
- lacune versus occlusion d'un gros tronc,
- occlusion permanente ou reperfusion (spontanée ou thérapeutique),
- absence ou présence d'une zone de pénombre.

2) Reproductibilité des volumes lésionnels

3) Fiabilité du contrôle des paramètres physiologiques (notamment de la température)

4) Faisabilité du modèle :

- La technique mise en jeu est-elle abordable en terme d'effort et de coût ?
- Autorise-t-elle le prélèvement des cerveaux pour évaluation lésionnelle ?

IV.1.c. β) ii) Les modèles "emboliques "

Le modèle thromboembolique est probablement le modèle imitant le plus fidèlement l'AVC ischémique humain dont le mécanisme le plus fréquent est thrombo-embolique. Par ailleurs, il présente l'avantage évident de permettre de tester des agents thrombolytiques. C'est d'ailleurs dans un modèle embolique chez le Lapin que Zivin et al. ont démontré en 1985 l'efficacité de l'activateur tissulaire du plasminogène, et ainsi établi la "preuve de concept" de la thrombolyse (Zivin et al., 1985). Ces modèles emboliques permettent d'étudier les conséquences de la thrombolyse et d'envisager des approches neuroprotectrices, la conjugaison de ces 2 modalités thérapeutiques restant problématiques dans les modèles expérimentaux et en clinique (voir pour revue (Wahlgren and Ahmed, 2004)).

En pratique, le modèle thromboembolique consiste à injecter des thrombus en général autologues dans les vaisseaux extracrâniens à destinée céphalique. Il s'agissait dans les premiers travaux de caillots humains ou de caillots homologues préparés en suspension. Les lésions ainsi induites se sont avérées très variables, notamment en raison d'une lyse spontanée

et précoce des caillots. Afin de contrôler d'avantage la formation de ces lésions distales et d'en augmenter la reproductibilité, la nature des embols utilisés a progressivement évoluée. Des caillots résistants à l'autolyse ont d'abord été employés puis les modèles de microembolisation par microsphères ont supplanté les modèles utilisant des caillots fibrino-cruoriques. Ce modèle dit des microsphères est actuellement couramment utilisé. Il présente l'avantage de créer des lésions multifocales et hétérogènes se développant progressivement au cours des 24 heures post-injection, imitant assez fidèlement les conséquences d'une "pluie d'embols" d'origine cardio-embolique par exemple (Mayzel-Oreg et al., 2004). Récemment, Orset et al. a développé un modèle thromboembolique élégant par micro-injections in situ de thrombine induisant la formation d'un caillot permettant de tester des agents de thrombolyse (Orset et al., 2007).

IV.1.c. β) iii) Les modèles d'occlusion permanente de l'ACM

- Les modèles de ligation/électrocoagulation de l'artère cérébrale moyenne : pMCAO

Il s'agit de modèles "chirurgicaux", globalement assez invasifs puisqu'ils nécessitent une craniectomie qui conduit à une exposition à l'air libre du parenchyme cérébral, une perturbation de la pression intracrânienne avec perte de liquide céphalo-rachidien, et altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Malgré ces inconvénients, ces modèles d'occlusion chirurgicale de l'artère cérébrale moyenne ont été beaucoup utilisés, initialement chez des primates non humains (Hudgins and Garcia, 1970), puis chez le Chat (MacDonald et al., 1972), le Chien (Suzuki, 1980), le Lapin (Meyer et al., 1986) et chez le Cochon (Imai et al., 2006). Mais c'est surtout chez le Rat que ce modèle a été particulièrement employé et chez qui des approches chirurgicales innovantes ont été développées afin de limiter le caractère traumatisant de la procédure par un abord orbital par exemple (O'Brien and Waltz, 1973). En général, l'occlusion est réalisée par cautérisation et par conséquence permanente. Quelques équipes ont utilisé des micro-clamps ou des ligatures autorisant une reperfusion (Shigeno et al., 1985) (Buchan et al., 1992).

Le modèle de pMCAO (**permanent Middle Cerebral Occlusion**) le plus utilisé a été décrit en 1981 par Tamura et al. (Tamura et al., 1981). Il consiste à cautériser la partie proximale de la ACM et par conséquence aboutit à la constitution d'un infarctus sylvien similaire en topographie à celui obtenu par occlusion intraluminale (cf) § IV.1.c. β) iiiii). En faisant varier

le niveau de l'occlusion sylvienne par électrocoagulation, et donc les possibilités d'éventuelles suppléances par des collatérales, Bederson et al 1986 ont finalement conclu à la nécessité d'une occlusion étendue sur le trajet de l'artère pour augmenter la reproductibilité des lésions (Bederson et al., 1986).

Ces modèles d'occlusion, permanente pour la plupart, ont été finalement très utilisés. Les différentes équipes, conscientes des artefacts potentiels liés à la procédure chirurgicale, ont tenté au maximum de limiter les biais. Leur objectif a été de limiter les lésions cérébrales per-opératoires, notamment thermiques et mécaniques, imputables à la craniectomie et à l'électrocoagulation. La simplification de la procédure chirurgicale permet également d'améliorer la reproductibilité intra et inter-opérateur.

Parallèlement, d'autres modèles d'occlusion permanente par des procédures non-invasives ont été développés.

- Modèle photothrombotique

La photothrombose est réalisée par injection intraveineuse d'une sonde photoactive (Rose Bengal) et irradiation par laser ciblée sur une région corticale. Cette irradiation combinée à la présence intravasculaire du colorant induit des lésions endothéliales focales aboutissant à une activation et aggrégation plaquettaire dans les vaisseaux piaux et parenchymateux de la zone irradiée (Dietrich et al., 1987b; Watson et al., 1985). Cette photothrombose occlut les artérioles terminales en quelques minutes et aboutit donc à la constitution d'un infarctus cortical, reproductible, sans zone de pénombre (Dietrich et al., 1987a). Ce type de modèle n'est donc pas adapté à l'étude d'un éventuel effet d'une molécule visant à augmenter la perfusion collatérale ou encore neuroprotectrice. C'est davantage un modèle exploitable pour l'évaluation d'une éventuelle réparation tissulaire post-ischémique.

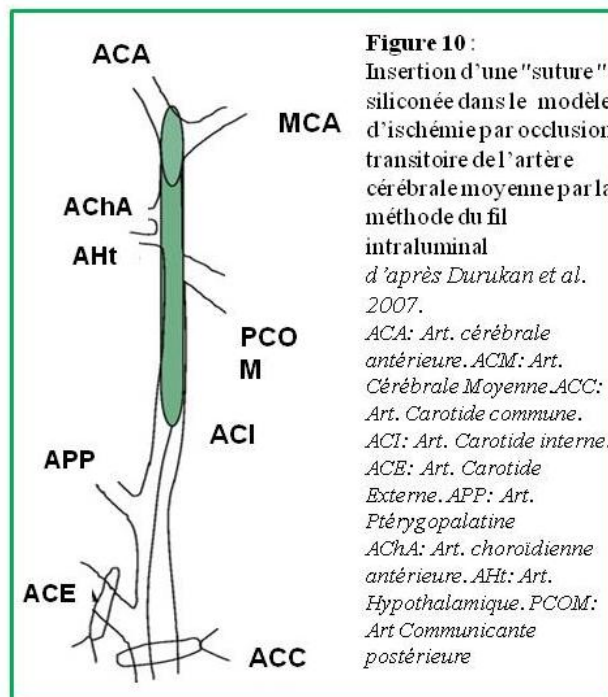
- Modèle de vasoconstriction par l'endothelin-1

L'endothelin-1 est un vasoconstricteur puissant qui peut être appliquée directement sur l'artère sylvienne (Robinson and McCulloch, 1990) ou à proximité par injection stéréotaxique (Sharkey et al., 1993) ou sur la surface corticale (Fuxe et al., 1997). Il en résulte une diminution du débit sanguin cérébral aboutissant à la constitution de lésions ischémiques dans la région cérébrale choisie, comparables à celles obtenues par occlusion chirurgicale de la sylvienne (Macrae et al., 1993). Cependant, le caractère dose-dépendant de la vasoconstriction induite par l'endothéline réduit les possibilités de contrôle de la durée et de

l'intensité de l'ischémie. Par ailleurs, l'endothéline agit indépendamment sur la réaction astrocytaire et la pousse axonale et interfère ainsi avec les mécanismes de réparation post-ischémique (Carmichael, 2005). Ces effets collatéraux limitent l'utilisation de ce modèle pour l'étude des mécanismes neuroprotecteurs.

IV.1.c. β) iii) Les modèles d'occlusion de l'ACM par la méthode du fil intraluminal

Il s'agit du type de modèle actuellement le plus couramment utilisé dans les études expérimentales de l'AVC. Ces modèles intravasculaires sont peu invasifs et relativement faciles de réalisation. Ils permettent de contrôler rigoureusement la formation de la lésion ischémique par occlusion permanente ou transitoire. Ces méthodes consistent en effet à cathétériser la carotide interne commune par un fil introduit par artériotomie (en général de la carotide externe). Ce fil (appelé "suture ") est en général inséré jusqu'à la naissance de l'artère cérébrale moyenne qu'il occlut (**figure 10**). Le choix de la forme de son extrémité, de sa taille et de la longueur d'insertion du fil, permet de sélectionner le niveau d'occlusion dans le réseau carotidien. Les infarctus obtenus sont dès lors reproductibles et le retrait du fil après un délai d'occlusion choisi permet la reperfusion. Cette ischémie-reperfusion peut être réalisée dans une IRM du petit animal à l'aide d'un dispositif adapté et ainsi permettre la visualisation des lésions focales précoces (Li et al., 1998).



Depuis sa première description en 1986 chez le Rat (Koizumi, 1986), ce modèle devenu classique, est continuellement en évolution et actuellement largement utilisé, notamment chez la Souris. La reproductibilité des lésions et leur taille sont particulièrement influencées par le type de "suture" utilisée : sa taille (Abraham et al., 2002), sa longueur d'insertion dans l'artère (He et al., 1999) et son "coating" par du silicone ou de la poly-L-lysine (Shimamura et al., 2006). Le fil de nylon recouvert par une couche de silicone (coating) est actuellement le type de suture le plus employé. Il a permis d'augmenter la taille des lésions par occlusion simultanée de l'artère cérébrale moyenne, de l'artère choroïdienne et de l'artère hypothalamique. (**Figure 10**). Ce coating permet par ailleurs de diminuer le risque de lésion vasculaire responsable d'hémorragie sous-arachnoïdienne, principale complication du modèle intravasculaire (Schmid-Elsaesser et al., 1998). L'autre effet secondaire principal du modèle est l'induction d'une hyperthermie par ischémie hypothalamique, quasi inévitable au-delà de 2 heures d'occlusion (Gerriets et al., 2004) (Li et al., 1999). Or cette hyperthermie aggrave les lésions ischémiques (cf § IV. 1. b) β). Ce biais incite à ne pas employer ce type de modèle utilisant une suture intraluminaire pour l'évaluation de thérapeutique potentiellement neuroprotectrice mais à lui préférer un modèle d'occlusion par macrosphères, préservant la perfusion de l'artère hypothalamique (Gerriets et al., 2003; Gerriets et al., 2004). L'autre écueil du modèle réside en une mauvaise insertion du fil. Pour contrôler ce positionnement de la suture, la plupart des équipes mesurent la microcirculation corticale dans le territoire de l'artère cérébrale moyenne par laser-doppler (Schmid-Elsaesser et al., 1998). Ce contrôle permet de vérifier en temps réel l'efficacité de l'occlusion sylvienne et la reperfusion.

IV.2) les modèles in vitro

Les méthodes in vitro et ex vivo sont des modèles d'ischémie permettant de s'affranchir de la variabilité rencontrée in vivo, mais ne présentant pas toutes les caractéristiques de l'ischémie observée in vivo. En particulier, les modèles in vitro ou ex vivo excluent forcément une mise en jeu du système immunitaire périphérique (cellules immunes sanguines infiltrant le tissu). Il existe trois modèles in vitro pour étudier l'ischémie cérébrale : les cultures primaires de neurones, les tranches de cerveau et les cultures organotypiques.

Les cultures primaires de neurones sont très reproductibles, mais modélisent assez mal les conditions ischémiques in vivo, puisqu'il s'agit le plus souvent de neurones fœtaux ne présentant pas ou peu de connections synaptiques et dont l'environnement in vitro est très éloigné de l'environnement des neurones matures adultes. Les tranches de cerveau présentent

le désavantage de ne pas se conserver et ne permettent donc que des études en phase aiguë, le plus souvent électrophysiologiques. Les cultures organotypiques offrent quant à elles l'avantage de pouvoir être maintenues jusqu'à un mois. Les cultures organotypiques, notamment hippocampiques, permettent par ailleurs de conserver le réseau neuronal tridimensionnel, son environnement, ainsi que les relations entre vaisseaux/cellules gliales et neurones au sein de l'unité neurovasculaire (del Zoppo, 2009), tout en autorisant un contrôle précis des facteurs cellulaires et humoraux conditionnant la viabilité neuronale. Leur longévité les rend particulièrement utile dans les expérimentations nécessitant une survie prolongée, comme les administrations chroniques de substances, l'analyse de la pousse axonale et/ou des mécanismes de régénération ainsi que l'effet à long terme de lésions traumatiques ou ischémiques sur le tissu cérébral (voir pour revue (Gahwiler et al., 1997).

Pour modéliser l'hypoxie, les cultures primaires de neurones et les tranches aiguës de cerveau, sont immergées dans un milieu sans sérum, sans oxygène et sans glucose, afin de mimer l'arrêt de l'approvisionnement en oxygène, glucose et nutriments du tissu cérébral lors de l'ischémie (He et al., 2009; Lobysheva et al., 2009). Les cultures organotypiques subissent elles aussi une OGD (*Oxygen-Glucose Deprivation*) en étant déposées sur une membrane en interface air-liquide, le liquide étant du milieu sans sérum et sans glucose et le gaz apporté du CO₂ (Mitrasinovic et al., 2001). Ce dernier modèle a récemment présenté un nouvel intérêt avec le développement des études cherchant à évaluer l'effet neuroprotecteur des greffes de cellules souches. En effet, l'analyse des interactions éventuelles entre la population greffée de cellules exogènes et le tissu cérébral est perturbée in vivo par les processus immunitaires de rejet. La mise en contact de cellules souches avec le tissu cérébral lésé maintenu en culture organotypique permet de contourner le problème (Kaushal and Schlichter, 2008; Sarnowska et al., 2009). L'équipe de Neumann et al. a particulièrement exploité ce modèle in vitro pour étudier les infiltrations de cellules notamment microgliales appliquées au tissu hippocampique ischémié, modélisant ainsi le recrutement cellulaire mis en évidence in vivo (Neumann et al., 2006). Ces interactions cellulaires peuvent être visualisées en temps réel grâce à l'imagerie biphotonique (time-lapse imaging) et leurs conséquences fonctionnelles éventuelles analysées par des techniques électrophysiologiques. Le modèle in vitro d'OGD permet également une approche électrophysiologique classique (Neumann et al., 2008).

2^{EME} PARTIE : LA REACTION INFLAMMATOIRE AU COURS DE L'ISCHEMIE CEREBRALE

I) LES PHENOMENES INFLAMMATOIRES AU CENTRE DE LA "CASCADE ISCHEMIQUE "

L'occlusion artérielle constitue l'élément déterminant de l'ischémie cérébrale. Cependant celle-ci correspond à un processus multiphasique (Dirnagl et al., 1999), la cascade ischémique, où les phénomènes inflammatoires jouent un rôle majeur (**Figure 11**). Cette réaction immunitaire, humorale et cellulaire participe activement aux processus lésionnels (Iadecola and Alexander, 2001) (Danton and Dietrich, 2003; Price et al., 2003).

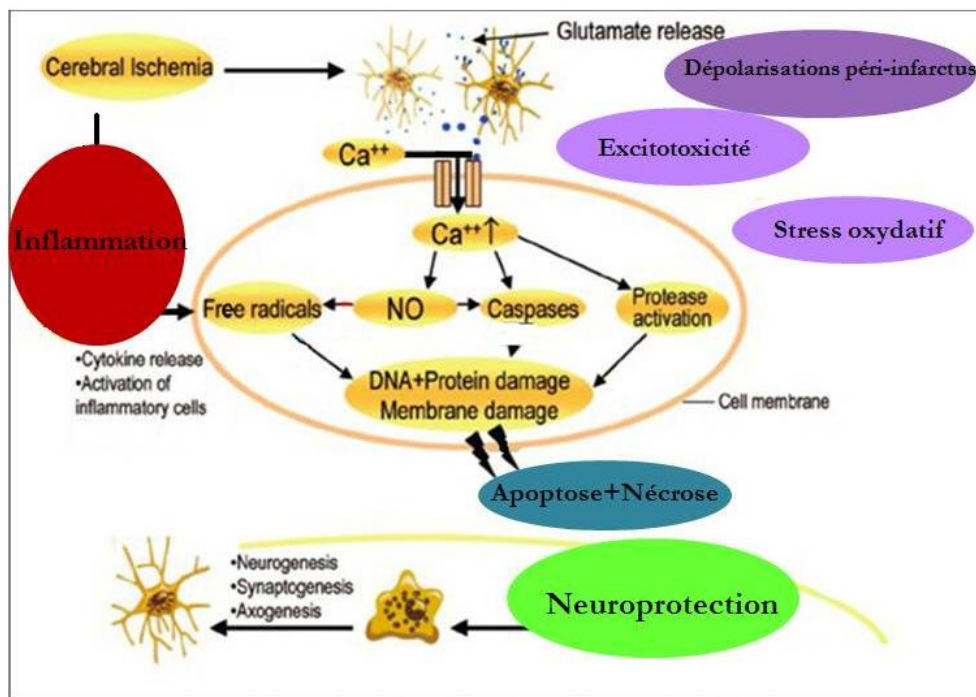


Figure 11: Représentation schématique de la cascade ischémique
D'après Rogalewski et al. Stroke 2006

I.1) Des effets non univoques et réciproques...

On dispose d'arguments expérimentaux en faveur du rôle néfaste de la réaction immunitaire sur le processus ischémique. Des souris immunodéprimées sur le versant lymphocytaire développent des lésions ischémiques cérébrales de taille diminuée par rapport aux contrôles (Hurn et al., 2007) (Yilmaz et al., 2006). De même, le blocage expérimental de l'infiltration post-ischémique du parenchyme cérébral par les leucocytes réduit la taille de l'infarctus cérébral (Yenari et al., 1998) (Connolly et al., 1997) (Soriano et al., 1999). Les effets

bénéfiques de l'induction d'une tolérance immunitaire par immunisation est un autre argument en faveur de l'implication des phénomènes inflammatoires sur le processus ischémique (Gee et al., 2008). Cet effet de la réaction inflammatoire est probablement hétérogène puisqu'un effet neuroprotecteur de l'activation immunitaire microgliale, a été démontré expérimentalement (Stoll et al., 1998). Le caractère potentiellement bénéfique de cette réaction inflammatoire post-ischémique est également suggéré par différents travaux expérimentaux (voir pour revue (Kriz and Lalancette-Hebert, 2009)) utilisant des molécules anti-inflammatoires (Hara et al., 1998), ou des délétions de cytokines pro-inflammatoires (Bruce et al., 1996).

Il faut noter que ces interactions entre phénomènes ischémiques et inflammatoires au cours de l'ischémie cérébrale ne sont pas unilatérales puisqu'une immunodépression systémique induite par l'ischémie a été constatée dans les modèles animaux d'AVC et dans les essais cliniques (Dirnagl et al., 2007) (Klehmet et al., 2009) (Offner et al., 2009).

I. 2) Objets et difficultés des études des phénomènes inflammatoires post-ischémiques

Parmi les travaux expérimentaux qui ont cherché à étudier les phénomènes inflammatoires post-ischémiques, on distingue schématiquement les études visant à décrire la dynamique spatio-temporelle des phénomènes immunitaires, en général cellulaires, et les études ciblées sur un aspect particulier de cette réaction inflammatoire (en général le recrutement/activation d'une population cellulaire et la détermination de son caractère bénéfique ou délétère). L'intrication des mécanismes ischémiques et inflammatoires rend difficile l'interprétation des résultats de ces études centrées sur des aspects limités de la réaction immunitaire au cours de l'ischémie cérébrale.

Par ailleurs, ces études ont été conduites dans des modèles variés, n'autorisant qu'une approche partielle des mécanismes inflammatoires, lesquels sont en outre influencés par de nombreux facteurs (site de l'occlusion vasculaire, taille et localisation de l'infarctus, survenue ou non d'une reperfusion et délai par rapport au début de l'occlusion, variabilité de la circulation collatérale, présence ou non de co-morbidités (métaboliques, sepsis, température, tabac...)).

Enfin, la définition même des phénomènes inflammatoires étudiés est parfois délicate à préciser. Les limites de la réaction inflammatoire, définie comme une réaction de défense immunitaire stéréotypée à une agression, sont difficiles à préciser en regard des autres mécanismes de la cascade ischémique, tels les phénomènes cytotoxiques, apoptotiques ou

oxydatifs. Cette complexité des phénomènes inflammatoires post-ischémiques pourrait rendre compte de l'échec relatif actuel des thérapeutiques anti-inflammatoires dans les essais cliniques (Durukan et al., 2008).

Néanmoins, les travaux " descriptifs " ont permis de globalement déterminer la chronologie de ces processus inflammatoires. Les études en imagerie (Jander et al., 2007) offrent l'avantage d'une description topographique de la réaction inflammatoire (surtout macrophagique) mais ne permettent pas une analyse quantitative de cette réaction. Inversement, la technique de cytométrie de flux permet une analyse qualitative et quantitative, et parfois même topographique du recrutement local et de l'infiltration de cellules immunes, quand elle est couplée à une étude immunohistologique (Gelderblom et al., 2009).

L'activation cellulaire est associée à des phénomènes d'adhésion cellulaire et de sécrétion de médiateurs moléculaires (cytokines, chimiokines et composés cytotoxiques), ainsi qu'à la régulation/modulation de l'expression de diverses molécules (protéines, récepteurs nucléaires).

I. 3) Les molécules de la réponse inflammatoire post-ischémique

I. 3. a) Cytokines et chimiokines

Les cytokines sont des molécules médiatrices et modulatrices de l'inflammation, qui contrôlent la réponse immune. Elles sont produites au décours de l'ischémie cérébrale par les populations cellulaires impliquées, immunocompétentes ou non. Elles sont ainsi sécrétées par les cellules neurales (gliales et neuronales), les cellules endothéliales, et les leucocytes et cellules du système des phagocytes mononuclés (Gong et al., 1998) (Huang et al., 2006).

Schématiquement, on peut considérer que certaines ont un rôle plutôt pro-inflammatoire et délétère (interleukine-1 (IL-1), ou -6 (IL-6), Tumeur Necrosis Factor α (TNF α)) et d'autres un effet plutôt neuroprotecteur (IL-10, Tumeur Growth Factor β (TGF β)) (Allan and Rothwell, 2001). Elles agissent non seulement en modulant l'expression des molécules d'adhésion (cf §I. 3) b)), et donc en orchestrant la réponse immune cellulaire, mais également en contribuant aux lésions tissulaires via la régulation des facteurs endogènes prothrombogènes (Thomas et al., 1993).

- Interleukine-1(IL-1)

Il existe 2 isotypes d'IL-1. La forme β est celle qui a été le mieux étudiée dans l'ischémie. Après un stress ischémique, sa synthèse est rapidement augmentée dans les cellules gliales et les neurones (Zhang et al., 1998b). Par exemple dans un modèle murin d'ischémie transitoire

globale, dès la première heure post-ischémie, une surexpression de l'ARNm IL-1 β a pu être mise en évidence (Haqqani et al., 2005). Cette élévation du taux d'IL-1 dans le tissu ischémié est corrélée à la sévérité des dommages tissulaire et son rôle délétère est clairement établi (Huang et al., 2006). L'administration intrathécale d'IL-1 chez le rat augmente le volume de la lésion ischémique (Yamasaki et al., 1995). Des souris déficientes pour le récepteur antagoniste de l'interleukine-1 (IL-1ra) présentent également des volumes lésionnels augmentés (Pinteaux et al., 2006). Au contraire, une administration d'IL-1ra après ischémie permanente chez le rat (pMCAO) diminue la sévérité du déficit neurologique et le volume de la nécrose ischémique (Garcia et al., 1995; Relton et al., 1996). Les mécanismes à l'origine de cet effet délétère sont à définir. Une injection intraventriculaire d'IL-1 recombinante après pMCAO majore l'œdème lésionnel et la taille de l'infarctus alors que l'influx et l'adhésion des polynucléaires neutrophiles sont augmentés (Um et al., 2003) (Yoshimoto et al., 1997). Ces résultats suggèrent que le rôle délétère de la surexpression d'IL-1 dans l'ischémie cérébrale pourrait être lié à son effet sur l'adhésion leucocytaire et la constitution de l'œdème cytotoxique.

- **TNF- α**

La cinétique d'expression du TNF- α est assez similaire à celle de l'IL-1, augmentant dès les premières heures post-ischémie, avec un second pic entre 24 et 36 heures (Offner et al., 2006a) (Liu et al., 1994). Son inhibition diminue le volume lésionnel ischémique alors que l'administration de TNF- α de synthèse le majore significativement (Barone et al., 1997a). On dispose par ailleurs de données expérimentales et cliniques montrant l'existence d'une corrélation entre le taux intrathécal augmenté de TNF- α et la taille lésionnelle (Zaremba and Losy, 2001). Le TNF- α induit l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et participe à l'accumulation et la transmigration des neutrophiles (Feuerstein et al., 1994). De plus, le TNF- α contribue à la dégradation de la BHE et stimule l'expression d'autres médiateurs impliqués dans la cicatrisation (Nawroth and Stern, 1986). Cependant, le TNF- α pourrait dans certaines conditions avoir un rôle anti-inflammatoire, impliquant le récepteur au TNF de type 1 (TNFR1), dont l'action au niveau cérébral reste à préciser (Hallenbeck, 2002). Ce récepteur pourrait intervenir dans les phénomènes de conditionnement à l'ischémie. Pradillo et al. (Pradillo et al., 2005) ont ainsi montré que l'administration d'un oligonucléotide antisens TNFR1 (siRNA), en diminuant l'expression de TNFR1, inhibait également l'effet protecteur du conditionnement ischémique. Les travaux de Lambertsen et al. suggèrent un rôle neuroprotecteur de l'expression microgliale de TNF, via le récepteur P55-R,

dans un modèle d'ischémie permanente chez la souris (Lambertsen et al., 2009). Globalement, ces effets paradoxaux plaident pour l'implication du TNF dans la modulation de la sensibilité neuronale à l'ischémie focale.

- **Interleukine-6**

La production d'IL-6 est parallèle à celle du TNF- α et de l'IL-1. Dans l'hémisphère cérébral ischémié d'un rat soumis à une occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne, l'IL-6 est produite dès 3 heures post-occlusion. Un pic d'expression est atteint à 12 heures et un taux élevé est maintenu pendant plus de 24 heures (Wang et al., 1995). Dans le sang périphérique de patients présentant un AVC, le niveau d'IL-6 augmente et devient détectable en quelques heures, comme dans le liquide céphalo-rachidien. Ce niveau d'IL-6 est corrélé à la taille de la lésion (Tarkowski et al., 1995) (Huang et al., 2006). Ces données expérimentales suggèrent que l'IL-6 serait pro-inflammatoire. Mais contrairement à L'IL-1 et au TNF, les souris mutées sur le gène de l'IL-6 ne développent pas de lésions ischémiques moins importantes par rapport aux animaux sauvages (Clark et al., 2000). En revanche, des études cliniques ont montré une corrélation entre le taux sérique d'IL-6 et l'évolution péjorative des patients atteints d'un accident ischémique cérébral (Rallidis et al., 2006) (Orion et al., 2008). Le rôle précis dans l'ischémie de l'IL-6 reste à préciser.

- **Interleukine-10**

L'IL-10 fait partie des cytokines anti-inflammatoires inhibant l'IL-1 et le TNF- α . Sa synthèse est augmentée en cas d'ischémie cérébrale (Strle et al., 2001). Les monocytes sanguins de patients présentant un AVC ont une expression augmentée d'IL-10 par rapport aux témoins (Pelidou et al., 1999). L'augmentation du taux sérique d'IL-10 apparaît comme un facteur prédictif indépendant du risque infectieux immédiat post-AVC (Chamorro et al., 2006). Cette corrélation traduit un rôle anti-inflammatoire et donc potentiellement immunosuppresseur. A l'inverse, les patients ayant un faible taux d'IL-10 auraient un risque accru d'AVC (Emsley and Tyrrell, 2002). Une étude récente montre que l'élévation du taux sérique d'IL-10 est corrélée à une évolution favorable de l'AVC ischémique chez l'Homme (Nayak et al., 2009). Expérimentalement, son administration diminue le volume des lésions dans un modèle murin d'ischémie permanente (Spera et al., 1998). Par ailleurs, dans un modèle murin d'AVC ischémique, il a été démontré que l'IL-10 synthétisée par une sous-population de lymphocytes

T (les lymphocytes T régulateurs) limiterait l'extension des lésions ischémiques (Liesz et al., 2009). De Bilbao et al. (de Bilbao et al., 2009) ont également montré qu'une surexpression constitutionnelle de l'Il-10 chez des souris transgéniques conférait une résistance à l'ischémie cérébrale.

- **TGF- β**

Le TGF- β est surtout produit par les cellules microgliales et les astrocytes, et en moindre quantité par les neurones. Dans des modèles murins d'ischémie, l'expression de TGF- β dans les tissus lésés augmente dans les 6 heures à l'issue de l'ischémie, et reste à un niveau élevé pendant 15 à 21 jours (Wiessner et al., 1993) (Lehrmann et al., 1995). De nombreuses données expérimentales suggèrent que le TGF- β jouerait un rôle neuroprotecteur dans la pathogénèse de l'ischémie (Huang et al., 2006). Dans un modèle d'hypoxie in vitro, Lu et al. ont montré que des cellules microgliales activées sécrétant du TGF- β pouvaient exercer un effet protecteur sur une population de neurones ayant subi une privation de glucose et d'oxygène (Lu et al., 2005). Cet effet neuroprotecteur dépend de la concentration de TGF- β , et est commun aux autres modèles d'hypoxie et d'excitotoxicité (McNeill et al., 1994).

Dans un modèle d'ischémie transitoire chez la Souris (tMCAO), la surexpression du gène TGF- β , obtenue par transfection intracérébrale par un vecteur viral, entraîne une diminution significative des volumes lésionnels (Pang et al., 2001). Dans des modèles d'AVC chez le Babouin et le Lapin, un effet neuroprotecteur de l'administration intracarotidienne de TGF- β réalisée avant l'ischémie, a également été mis en évidence (Gross et al., 1993; Mori et al., 1992). Cet effet est corrélé à la diminution rapide et massive du nombre de polynucléaires neutrophiles (Mori et al., 1992) et ne semble pas être maintenu si l'injection est post-ischémique (Gross et al., 1994). Les modalités d'action du TGF- β restent mal élucidées. Il pourrait agir en limitant les phénomènes excitotoxiques (Ruocco et al., 1999) et oxydatifs (Huang et al., 1994) de la cascade ischémique.

- **Les chimiokines (CINC et MCP-1)**

Les chimiokines (4 sous-familles : CXC, CC, C et CX3C) représentent une sous-classe de cytokines de faibles poids moléculaires (8 à 10 kDa), qui interagissent avec des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, et exprimés à la surface de nombreuses cellules. La production et la sécrétion de ces facteurs sont stimulées par l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'Il-1 et le TNF- α (Gourmala et al., 1997) (Minami and

Satoh, 2003). La Cytokine-induced neurophil chemoattractant (CINC) ainsi que la Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) sont impliquées respectivement dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles et des macrophages/monocytes inflammatoires au sein du cerveau ischémié (Minami and Satoh, 2003) (Schilling et al., 2009). Des travaux récents ont relié l'expression de la MCP-1 et le volume lésionnel, suggérant que les monocytes attirés dans le tissu ischémié par la chimiokine seraient impliqués dans la constitution des lésions.

I. 3. b) Les molécules d'adhésion

- Sélectines

Les interactions entre les cellules endothéliales et les éléments figurés du sang sont essentiellement conditionnées par les molécules d'adhésion cellulaire. Lors d'une ischémie, les cellules endothéliales activées expriment à leur surface des sélectines (essentiellement E et P au stade initial). Celles-ci vont interagir avec l'oligosaccharide sialyl Lewis-X membranaire des leucocytes circulant qui ralentissent ainsi au contact de l'endothélium (voir pour revue (Huang et al., 2006)). L'expression des sélectines P et E augmente dans différents modèles d'occlusion transitoire ou permanente de l'artère cérébrale moyenne (pMCAO et tMCAO) chez le Rat (Zhang et al., 1998a).

Le rôle des sélectines E et P dans le recrutement des leucocytes dès le stade initial de l'ischémie a été évoqué lors de leur surexpression transitoire entre 2 et 8 heures à l'issue de l'ischémie, le retour au niveau de base est observée à la 24^{ème} heure (Okada et al., 1994; Suzuki et al., 1998). Si le rôle précis des E-sélectines reste mal élucidé, celui des P-sélectines est plus clairement établi grâce à des données expérimentales et cliniques. Des souris mutées n'exprimant pas les P-sélectines développent des lésions de plus petit volume et ont un meilleur taux de survie post-ischémie (Connolly et al., 1997).

Une étude clinique récente montre que l'expression de la P-sélectine à la surface plaquettaire est corrélée à la sévérité clinique post-AVC (Cha et al., 2002). Les P-sélectines favorisent l'adhésion leucocytaire à l'endothélium ischémié ; ce mécanisme semble jouer un rôle essentiel (Huang et al., 2006) (del Zoppo, 2009).

- Les intégrines et les membres de la superfamille des immunoglobulines

La famille des intégrines est constituée pas des glycoprotéines membranaires hétérodimériques jouant un rôle crucial dans les interactions intercellulaires et avec la matrice extracellulaire. Au niveau cérébral, les intégrines relient les cellules endothéliales, les astrocytes et la lame basale, qui constituent la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ce sont des molécules essentielles au maintien de l'intégrité de la microvascularisation cérébrale (Haring et al., 1996). Les intégrines CD11b/CD18 (Mac-1) sont les principales molécules d'adhésion exprimées au niveau de la membrane des leucocytes. Elles sont activées par diverses substances chimioattractantes, en particulier des cytokines et chimiokines.

Les molécules d'adhésion intracellulaire (ICAM) de la superfamille des immunoglobulines, notamment ICAM-1 (CD54) sont exprimées par la membrane des cellules endothéliales, également stimulées par les cytokines. Après le ralentissement des leucocytes et le "rolling" médié principalement par les sélectines, le contact entre leurs intégrines $\beta 2$ membranaires et les ICAM-1 endothéliales entraîne leur adhésion et leur diapédèse (von Andrian et al., 1991). Monocytes et leucocytes, adhèrent également en présentant leurs intégrines $\alpha 4\beta 1$, aux VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) des cellules endothéliales et du stroma sous-endothélial (Frijns and Kappelle, 2002). L'hypoxie stimule efficacement l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales via les interactions CD11b/CD18 avec ICAM-1 (Stanimirovic et al., 1997).

Différents ligands ont été utilisés chez l'animal pour saturer ou bloquer (par des anticorps) ces récepteurs membranaires avec des résultats prometteurs en terme de réduction du volume lésionnel (Chen et al., 1994; Zhang et al., 1995b) (Yenari et al., 1998). Des souris transgéniques n'exprimant pas le gène de la $\beta 2$ intégrine développent de plus petites lésions après ischémie focale transitoire (tMCAO), avec des dépôts capillaires de polynucléaires neutrophiles réduits (Prestigiacomo et al., 1999). Ces résultats suggèrent qu'au cours de l'ischémie, le CD11b/CD18 pourrait non seulement jouer un rôle dans le recrutement des cellules inflammatoires mais aussi participer à la réduction des phénomènes de lésion de reperfusion. Ce phénomène d'adhésion cellulaire favoriserait les dépôts cellulaires dans les petits vaisseaux qui resteraient alors occlus et participerait ainsi au phénomène de "no-reflow", malgré une recanalisation artérielle proximale (del Zoppo et al., 1991).

En effet, lors de l'utilisation d'anticorps anti-ICAM-1 chez le rat, une réduction du volume lésionnel de l'ordre de 40% a été constatée dans un modèle d'ischémie transitoire (tMCAO), mais pas dans l'équivalent par occlusion permanente (pMCAO) (Zhang et al., 1995a).

Si indéniablement ces molécules d'adhésion jouent un rôle central dans la pathogénèse des lésions ischémiques et nécessitent donc une meilleure compréhension, les applications thérapeutiques demeurent incertaines. Les récents essais cliniques utilisant des anticorps bloquant dirigés contre le CD11b/CD18 n'ont pas démontrés d'efficacité (Mocco et al., 2002). De même que l'essai clinique de phase III (Enlimomab, Boehringer, Ingelheim, Allemagne) qui testait un anticorps anti-ICAM-1 administré 6 heures après le début de l'AVC (Polmar, 1996). Néanmoins, ces mécanismes précoces d'adhésion représentent des pistes thérapeutiques potentielles, d'autant plus que certains couples d'intégrines/ligand a priori plus "accessoires" ont été peu étudiés dans l'ischémie (Huang et al., 2006). C'est le cas notamment du couple formé par the platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) avec ICAM-2, impliqué dans la transmigration leucocytaire post-ischémique (Frijns and Kappelle, 2002).

I. 3. c) Les dérivés de l'acide arachidonique

Les prostaglandines et les thromboxanes, regroupés sous le nom de prostanoides sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique via la voie de la cyclooxygénase (COX). Ce sont d'importants régulateurs de l'inflammation. Il existe trois isoformes de la cyclooxygénase, enzyme limitante pour la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine H2 (PGH2). COX1 est d'expression constitutive dans la plupart des cellules de l'organisme et participe à diverses fonctions physiologiques (sécrétion gastrique, fonction plaquettaire). COX2 est présente de manière constitutive dans certains organes comme le cerveau, mais son expression peut être fortement accrue par divers stimulus, en particulier pro-inflammatoires. COX3 est une variante de COX1 abondante dans le myocarde et le cerveau, et inhibée par le paracétamol (Iadecola and Gorelick, 2005). La signalisation du système COX est d'une grande complexité. La PGH2 peut être convertie en cinq différents prostanoides par 5 isomérases spécifiques dont la distribution varie selon le type cellulaire et l'organe. De plus, les prostanoides peuvent agir sur de multiples récepteurs dont les effets sont souvent opposés. L'ischémie cérébrale induit l'expression de la COX2 par les neurones, les cellules gliales et vasculaires, ainsi que par les cellules inflammatoires infiltrant le tissu ischémique, et ce aussi bien dans les modèles expérimentaux qu'au cours des infarctus humains (Nogawa et al., 1997) (Iadecola et al., 1999).

L'inhibition de la COX2 dans un modèle murin permet de réduire les lésions ischémiques dans une fenêtre thérapeutique prolongée (jusqu'à 24h post-ischémie) (Sugimoto and

Iadecola, 2003). Les lésions ischémiques sont réduites chez les souris transgéniques knock-out (KO) pour COX2, et augmentées chez celles surexprimant COX2 (Dore et al., 2003; Iadecola et al., 2001). La neurotoxicité de la COX2 apparaît médiée par certains prostanoïdes et les radicaux libres générés par cette voie métabolique. La prostaglandine E2 (PGE2) semble être particulièrement pathogène, via l'activation d'un de ses récepteurs, EP1 (Iadecola and Gorelick, 2005).

Ces données expérimentales suggèrent ainsi un intérêt thérapeutique potentiel à l'inhibition de la COX2 au cours de l'ischémie cérébrale. Des molécules inhibitrices ciblant spécifiquement la COX2 ont été développées initialement afin d'atténuer la toxicité gastrique des inhibiteurs non sélectifs. Ces inhibiteurs de la COX2 (celecoxib et le rofecoxib) suppriment la production de la prostacycline PGI2 sans modifier celle du thromboxane A2 (TXA2). Or la PGI2 endothéliale est vasodilatatrice et inhibe l'agrégation plaquettaire ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses. Au contraire, le TXA2 est pro-aggrégant plaquettaire, vasoconstricteur et stimule la prolifération des cellules musculaires lisses (Fitzgerald, 2004). En conséquence, malgré de solides données expérimentales suggérant l'intérêt thérapeutique potentiel de l'inhibition de la COX2, les traitements actuellement disponibles sont responsables de complications cardiovasculaires iatrogènes, consécutives au déséquilibre de la balance PGI2/TXA2 (Mukherjee et al., 2001). La perspective du développement d'inhibiteurs plus spécifiques des différents récepteurs aux prostanoïdes reste intéressante.

I. 3. d) Les radicaux libres

- NO et NO synthases

L'oxyde nitrique (NO) est un radical libre pouvant jouer dans le cerveau aussi bien un rôle de messenger moléculaire que de neurotoxine. En tant que messenger moléculaire, le NO interviendrait dans de multiples fonctions cérébrales : plasticité synaptique, morphogenèse, régulation de la neurotransmission et vasorelaxation cérébrale. A l'inverse, le NO a été impliqué comme facteur toxique au cours des infections du système nerveux central, des pathologies inflammatoires, toxiques et neurodégénératives, de l'infection par le HIV et de l'ischémie cérébrale (Iadecola and Ross, 1997). Le NO est synthétisé par oxydation de la L-arginine via une enzyme, la NO synthase (NOS) en présence de nombreux cofacteurs tels le nicotinamide-adenine-dinucléotide phosphatase (NADPH) et la tétrahydrobioptérine (Brune et al., 1998). Il existe 3 isoformes de NOS :

- La NOS neuronale (nNOS ou NOS I) exprimée de manière constitutive dans certains neurones.
- La NOS endothéliale (eNOS, NOS III) exprimée constitutivement dans les cellules endothéliales
- La NOS inductible (iNOS, NOS II) n'est pas présente à l'état basal, mais sa transcription dans les cellules astrocytaires et gliales, l'endothélium vasculaire et les macrophages, peut être induite par certains stimulus (endotoxines et cytokines).

- NOS neuronales, iNOS et ischémie cérébrale et effets délétères

Au cours de l'ischémie cérébrale, le NO synthétisé par la NOS neuronale est impliqué dans l'excitotoxicité du glutamate et les étapes précoces de la cascade ischémique (Huang et al., 1994). Le NO ainsi produit participe à la formation de radicaux libres, en particulier de peroxy-nitrites par combinaison avec l'anion superoxyde (Beckman et al., 1990). Au sein des cellules neuronales mais aussi endothéliales, ces radicaux libres sont responsables de la peroxydation des lipides membranaires et de l'oxydation des protéines, contribuant ainsi à la mort cellulaire (Iadecola, 1997).

L'expression de la iNOS est stimulée par les cytokines pro-inflammatoires produites durant l'ischémie (IL1 β , IL6, TNF α) via les facteurs de transcription IRF-1 (interferon regulatory factor-1) et NF- κ B. La région promotrice d'iNOS contient aussi un site de liaison pour HIF-1 (hypoxia inducible factor-1), suggérant que l'hypoxie pourrait induire directement sa transcription. Iadecola et al. ont montré chez le rat que l'ARNm de la iNOS est exprimé au cours d'une ischémie cérébrale focale par les cellules endothéliales et inflammatoires (Iadecola et al., 1996). Si l'ischémie est transitoire (tMCAO), l'expression de l'iNOS est maximale à 12 heures et se normalise vers le 4^{ème} jour. Dans un modèle ischémique permanent (pMCAO), le pic est retardé à la 48^{ème} heure, suivi d'une normalisation au 7^{ème} jour. Cette expression inductible est principalement le fait des polynucléaires neutrophiles infiltrant la périphérie de la lésion. L'aminoguanidine, un inhibiteur de la iNOS, permettait une réduction de l'activité de la iNOS et du volume lésionnel après une ischémie transitoire ou permanente (Iadecola et al., 1995). L'activité de la iNOS étant continue, la production de NO dépend de la disponibilité en substrats et cofacteurs. Ainsi, l'administration en période post-ischémique de L-arginine, précurseur de la NO, est délétère et responsable d'une augmentation du volume lésionnel dans un modèle murin de tMCAO (Zhang et al., 1996). La même équipe a

également montré une réduction du volume de l'infarctus de 30-40% chez des souris transgéniques mutées pour le gène iNOS.

- **NOS endothéliale et potentiels effets bénéfiques**

En balance de ces effets délétères, le NO pourrait aussi avoir des effets favorables au cours de l'ischémie cérébrale (Iadecola, 1997). De nombreux travaux réalisés ces dernières années ont permis d'identifier l'impact favorable du NO, via l'activation de la NOS de type III, l'isoforme endothéliale (Iadecola, 1997) (Samdani et al., 1997). Cet effet résulterait en partie de l'amélioration du débit sanguin cérébral via la vasorelaxation induite par le NO endothélial (Samdani et al., 1997). Le NO améliorerait la microcirculation par ses effets fibrinolytiques, antiagrégant plaquettaire et antiadhésion leucocytaire (Iadecola, 1997).

En somme, le développement d'éventuelle thérapeutique neuroprotectrice devrait tenir compte des effets équivoques et privilégier la voie de la NOS endothéliale au détriment de l'iNOS et de la NOS neuronale.

I. 4) La dynamique schématique de la réponse inflammatoire cellulaire

La chronologie des événements cellulaires de la réaction inflammatoire post-ischémie décrite peut être résumée **figure 12**, par les résultats obtenus par cytométrie de flux et immunohistochimie dans un modèle murin d'ischémie transitoire (tMCAO) par Gelderblom et al. (Gelderblom et al., 2009). Ces résultats sont cohérents avec les études précédentes. Ils confirment le recrutement massif des cellules du système des phagocytes mononuclés (microglie, macrophages, monocytes) (Iadecola and Ross, 1997) (Price et al., 2003) (Danton and Dietrich, 2003) et la prédominance des polynucléaires neutrophiles au sein de l'hémisphère ischémie au 3^{ème} jour post-ischémie (Clark et al., 1994; Connolly et al., 1996). En revanche, l'influx dans le parenchyme cérébral de ces polynucléaires apparaît dans ce modèle d'ischémie/reperfusion plus tardif en regard des descriptions antérieures (Garcia et al., 1994). Cet influx de polynucléaires serait secondaire à l'accumulation des cellules microgliales et macrophagiques. Ces cellules immunes activées produisent des médiateurs cytokiniques pro-inflammatoires, lesquels influencent l'expression de molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement et la migration des cellules inflammatoires (Huang et al., 2006).

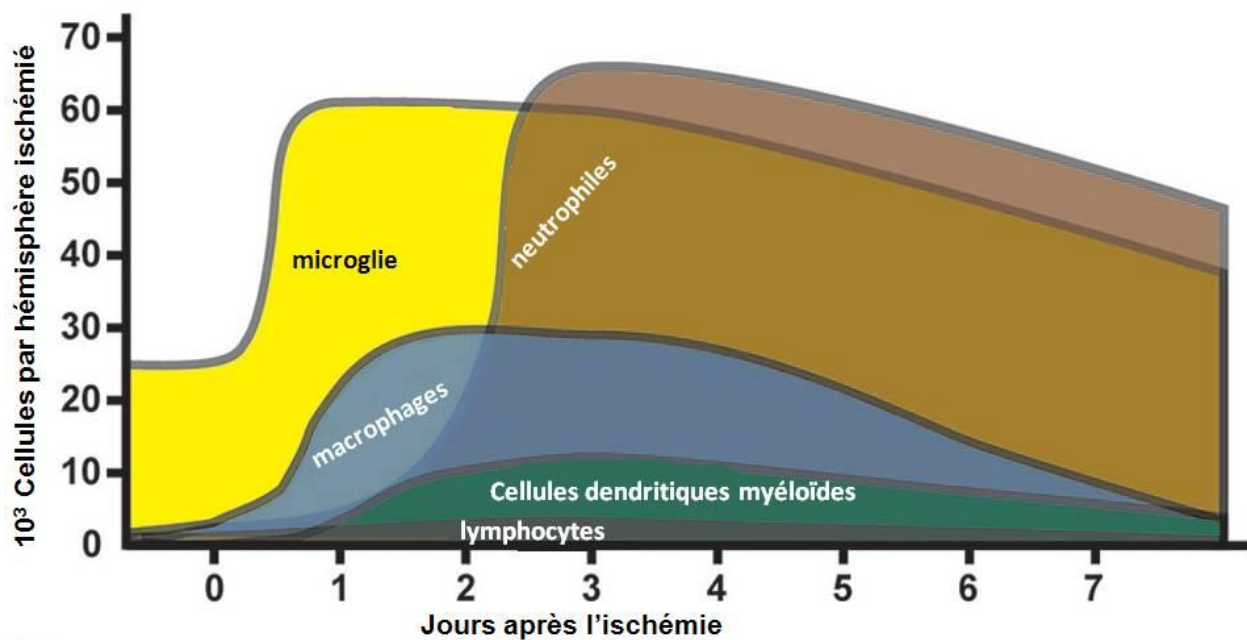


Figure 12 : Représentation schématique de la dynamique spatio-temporelle de la réaction inflammatoire cellulaire post-ischémique. *D'après Gelderblom et al. Stroke 2009*

La réaction inflammatoire cellulaire post-ischémique apparaît ainsi définitivement dominée par le recrutement et l'activation des cellules du système des phagocytes mononucléés. D'autres acteurs du système immunitaire participent néanmoins à cette inflammation post-ischémique. Il s'agit des cellules immunes sanguines et des cellules du parenchyme cérébral composant l'unité neurovasculaire : astrocytes, cellules endothéliales et neurones.

II) UNE REACTION INFLAMMATOIRE DOMINEE PAR LES CELLULES DU SYSTEME DES PHAGOCYTES MONONUCLEES

II. 1) Les cellules du système des phagocytes mononucléés (PM)

Macrophages et cellules dendritiques (DC) constituent un réseau de cellules phagocytaires regroupées sous le terme de phagocytes mononucléés (PM), présentes dans la plupart des tissus et jouant un rôle majeur au cours du développement et des processus inflammatoires (Sasmono et al., 2003). L'origine des DC reste controversée (Auffray et al., 2009b; Liu et al., 2009), et ne sera pas abordée dans ce travail. On retiendra seulement que l'origine myéloïde d'au moins une sous-population de DC est actuellement acceptée (Fogg et al., 2006).

II. 1. a) Les macrophages tissulaires

II. 1. a. α) Origine des macrophages tissulaires

- *Les monocytes sanguins*

L'ensemble des macrophages tissulaires dérive de cellules sanguines dérivant de la moelle osseuse : les monocytes. Ceux-ci sont relargués dans le sang, où ils circulent pendant plusieurs jours avant d'entrer dans les tissus pour renouveler les macrophages tissulaires résidents (Gordon and Taylor, 2005). La morphologie des monocytes matures dans la circulation périphérique est hétérogène (Passlick et al., 1989) (Grau et al., 2000) (Geissmann et al., 2003). Les monocytes constituent entre 5 et 10 % des leucocytes périphériques (Auffray et al., 2009b). Ils varient en taille et ont différents degrés de granularité, et la morphologie de leur noyau est variée. Si cette hétérogénéité morphologique et phénotypique de la population monocyttaire sanguine a été étudiée depuis longtemps, c'est depuis peu qu'une hétérogénéité fonctionnelle a été mise en évidence. En effet, trois sous-populations fonctionnelles monocytaires humaines et deux murines ont été identifiées. Elles semblent être impliquées *in vivo* spécifiquement dans certains processus homéostasiques et inflammatoires (Auffray et al., 2009b). Cette dichotomie n'est pas sans rappeler celle des programmes d'activations macrophagiques (classiques et alternatives) qui seront décrits ci-après § II. 1) b) γ).

- *Origine des monocytes sanguins*

Ce sont les cellules souches hématopoïétiques qui donnent naissance à des progéniteurs engagés dans la lignée hématopoïétique. On distingue les progéniteurs lymphoïdes qui se différencient en cellules pré-B ou pré-T, alors que les progéniteurs myéloïdes se différencient en cellules précurseurs, incluant les érythroïdes, les éosinophiles les mégacaryocytes, les mastocytes et les cellules formant les granulocyte-macrophages (Metcalf, 1995). L'engagement de la lignée macrophagique coïncide donc avec l'engagement des granulocytes. La différenciation débute par des progéniteurs très indifférenciés, les CFU-GEMM (Colony Forming Unit Granulocyte, Erythroïd, Megacaryocyte, and Monocyte), sous l'influence de diverses cytokines (Flt3-l, GM-CSF, IL-3), ceux-ci vont évoluer vers des progéniteurs plus différenciés. Ces progéniteurs myéloïdes, CFU-GM, vont proliférer en présence d'IL-3 et de GM-CSF (Granulocyte, Macrophage, Colony Stimulating Factor).

Ensuite, la présence de M-CSF différencie vers les progéniteurs CFU-M, puis vers les précurseurs monocytaires. Le développement des monocytes sanguins apparaît donc dépendant du facteur de croissance M-CSF. L'ensemble de ces étapes s'effectue en 4 à 5 jours, puis le monocyte médullaire réside dans la moelle osseuse un jour avant de migrer dans le sang périphérique. Les mécanismes contrôlant cette émergence des monocytes sanguins à partir de la moelle osseuse ont fait l'objet d'études (Serbina et al., 2008). Cette migration peut notamment être stimulée par des mécanismes inflammatoires faisant intervenir diverses chimiokines et leurs ligands (CX3CR1, CCR5, CCR2) (Auffray et al., 2009a; Auffray et al., 2009b).

II. 1. a. β) Fonctions des macrophages tissulaires

II. 1. a. β) i) La phagocytose

La phagocytose est la première ligne de défense contre les pathogènes, les agressions venues de l'extérieur, mais aussi les cellules du soi-modifié et les cellules en apoptose.

La phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages est composée de quatre étapes majeures : (1) la reconnaissance de la cellule cible de phagocytose, (2) l'attachement du phagocyte à cette cellule, (3) la phagocytose, (4) la production de signaux pros ou anti-inflammatoires.

Les molécules membranaires portés par les cellules apoptotiques et reconnues par les cellules phagocytaires sont appelés "eat me signals" (signaux mangez-moi), et sont multiples. Le plus connu est le phospholipide phosphatidylsérine (PS), qui est normalement présent dans le cytoplasme, et qui est exporté à la membrane lors de l'apoptose. On peut également citer la calréticuline (Gardai et al., 2005) ou l'ADN fragmenté qui peut être porté à la surface de la cellule apoptotique (Palaniyar et al., 2004).

II. 1. a. β) ii) Rôle trophique

Les macrophages expriment un impressionnant cocktail de cytokines et de facteurs mitogénique, notamment l'IGF1, le TGF- α , le PGF et le TGF- β (Rappolee and Werb, 1988), et beaucoup d'autres molécules diffusibles, telles que les interleukines (IL), le VEGF, le RANKL (Receptor activator NF-kappaB ligand) et le LIF (Leukemia inhibitory factor) (Hume

et al., 2002). Les macrophages du cerveau (la microglie) sont une source importante de facteurs neurotrophiques assurant la croissance et la survie neuronale (Mallat et al., 1989).

II. 1. a. β) iii) Régénération / réparation

Les macrophages sont impliqués dans la réparation des tissus lésés et dans la cicatrisation des plaies. Leibovich et Ross, ont montré qu'une déplétion en macrophages empêchait leur recrutement au sein de la plaie et sa cicatrisation par défaut d'élimination des cellules mortes, des débris tissulaires et des caillots de fibrine (Leibovich and Ross, 1975).

Les macrophages possèdent aussi des capacités de régénération d'autres tissus, notamment le tissu neuronal. Récemment, Gensel et al. (Gensel et al., 2009) ont montré qu'une activation de macrophages spinaux activés favorisait la pousse axonale dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de lésion traumatique du ganglion rachidien postérieur. Des effets simultanés et ambivalents des macrophages activés sur la mort de neurones ganglionnaires et sur leur régénération ont été observés. Cette étude a ainsi mis en évidence l'existence de processus pro-régénératifs et neurotoxiques concomittants, médiés par l'activation macrophagique (Gensel et al., 2009). Ces effets divergents de macrophages activés illustrent des voies d'activation différentes. Plusieurs types de programmes d'activation macrophagiques sont induits au cours d'un processus lésionnel et conduisent à une "polarisation" du macrophage activé vers un profil délétère ou bénéfique.

II. 1. a. γ) Macrophages activés

L'activation macrophagique est conditionnée par les stimulations micro-environnementales auxquelles elle est soumise. *In vitro*, selon la nature des signaux activateurs (le plus souvent des cytokines), les macrophages activés adoptent un profil fonctionnel et phénotypique adapté se traduisant par l'expression spécifique d'une ensemble de cytokines, de récepteurs membranaires d'enzymes (Edwards et al., 2006). Ces profils d'activation macrophagiques sont retrouvés *in vivo*, dans des conditions inflammatoires pures ou à composante inflammatoire (comme la tumorigenèse), où un continuum d'états fonctionnels macrophagiques a été mis en évidence (Gordon, 2003). A ses extrêmes, on retrouve caractérisés les macrophages activés classiquement M1 (pro-inflammatoire) et les macrophages activés alternativement M2 (dits anti-inflammatoires)

II. 1. a. γ) i) Macrophages activés classiquement M1

Les macrophages M1 sont dits pro-inflammatoires, c'est-à-dire qu'ils sont impliqués dans le développement de l'inflammation. Ils produisent essentiellement de l'IL-1, l'IL6, l'IL-12, l'IL-23, du TNF, et iNOS. In vitro, on peut induire une activation de type M1 avec du LPS ou de l'IFN- γ (Mantovani et al., 2002).

II. 1. a. γ) ii) Macrophages activés alternativement M2

Les macrophages M2 sont dits anti-inflammatoires, c'est-à-dire qu'ils interviennent plutôt dans la réparation des tissus. Il s'agit d'un terme générique recouvrant en fait plusieurs formes d'activation macrophagique non pro-inflammatoire (Mantovani et al., 2004). Ils produisent essentiellement l'IL-1ra, l'IL-10, le TGF- β et ARG-1. In vitro, on peut induire une activation de type M2 par différents moyens, notamment par l'IL-4, l'IL-13, les glucocorticoïdes ou le TGF- β .

La **Figure 13** représente schématiquement les programmes d'activation macrophagique M1 et M2, les différentes molécules et récepteurs exprimés par les macrophages selon leur état d'activation et les molécules susceptibles d'induire cet état d'activation (d'après (Mantovani et al., 2005) (Mantovani et al., 2004)).

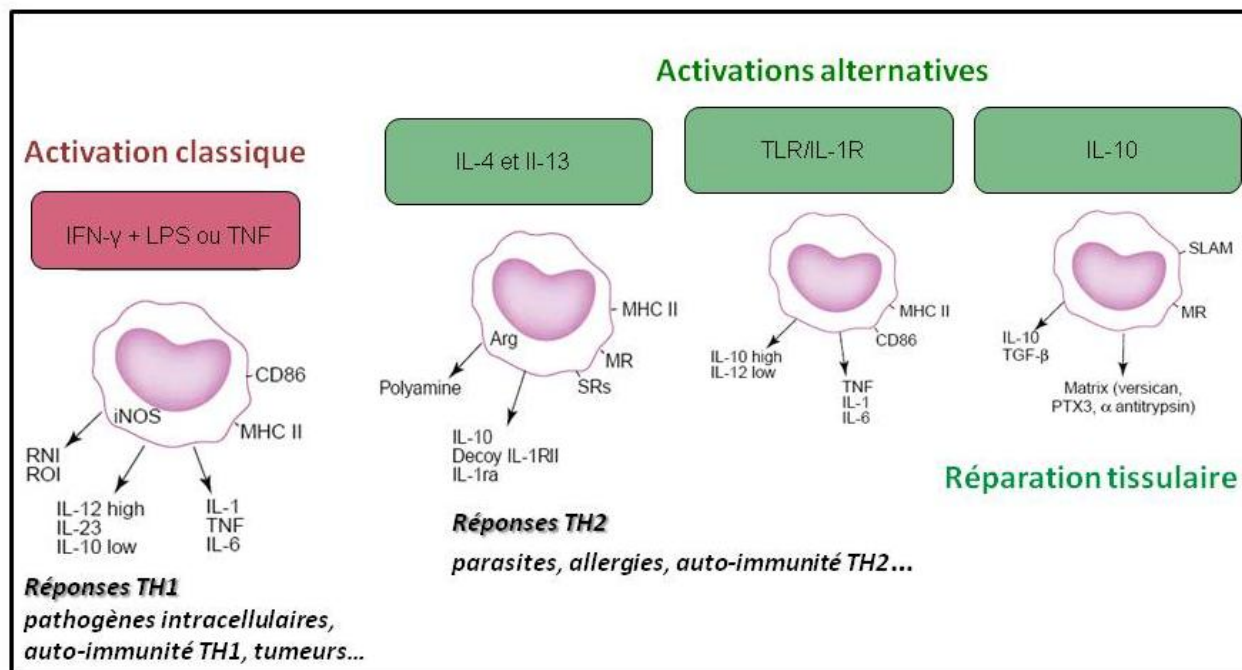


Figure 13: Récapitulatif des différents programmes d'activation macrophagique selon le type de stimulation et les récepteurs et molécules exprimés par les macrophages « polarisés » d'après Mantovani et al. 2004

On notera qu'aucune étude ne rapporte à ce jour de données expérimentales spécifiques concernant la cinétique d'expression des cytokines M1 versus M2 dans des modèles d'ischémie cérébrale.

II. 1. b) Les macrophages du SNC

Différentes populations de macrophages résident dans le SNC : i) les cellules microgliales, localisées au sein même du parenchyme nerveux ; ii) les macrophages méningés et ii) les cellules de Mato, encore appelés macrophages périvasculaires, et qui sont localisés dans la paroi des microvaisseaux cérébraux.

II. 1. b. α) La microglie

II. 1. b. α) i) Origine des cellules microgliales

Origine des microglies embryonnaires et fœtales

L'hypothèse mésodermique

Le premier à évoquer l'hypothèse d'une origine mésodermique de la microglie fut Del Rio Hortega (1932). Grâce à des colorations argentiques, il mit en évidence l'existence de concentrations de cellules microgliales (nommées "fontaines de microglie ") situées au niveau d'éléments de la pie-mère dérivant du mésoderme. Ces cellules colonisaient ensuite le cerveau embryonnaire avant de se transformer en cellules microgliales amiboïdes puis ramifiées. Plus récemment, ont été mises en évidence deux sous populations de précurseurs microgliaux au cours du développement (Andjelkovic et al., 1998). Il y aurait ainsi une première vague de colonisation du SNC par des précurseurs microgliaux dérivants du sac vitellin, puis une seconde vague de précurseurs de nature monocytaire, circulants, dérivant des sites d'hématopoïèse actifs (Kaur et al., 2001).

L'hypothèse neurectodermique

Il a également été proposé une hypothèse neurectodermique, selon laquelle une sous-population microgliale dériverait de cellules gliales, originaires du neurectoderme (Kitamura et al., 1984). Par la suite, plusieurs équipes ont montré que les cellules microgliales exprimaient certains marqueurs phénotypiques communs à d'autres types cellulaires tels que

les oligodendrocytes ou les astrocytes (Wolswijk, 1994) (Yokoyama et al., 2006). Cette hypothèse est d'actualité malgré la prédominance de l'hypothèse mésodermique.

Origine des cellules microgliales post-natales

Chez la souris, l'infiltration des précurseurs microgliaux se poursuit au stade post-natal. Parallèlement, les cellules microgliales amiboïdes vont migrer et proliférer de manière considérable jusqu'à P18, puis elles vont diminuer leur prolifération et adopter une morphologie très ramifiée, caractéristique des cellules microgliales quiescentes (Ladeby et al., 2005). Chez l'Homme, la colonisation et la prolifération microgliales s'achèvent à la naissance. Ainsi, la maturation et la localisation des cellules microgliales au stade post-natal sont les mêmes qu'au stade adulte (Rezaie et al., 1999).

Origine des cellules microgliales adultes

Dans la conception classique de la différenciation du lignage monocytaire (Auffray et al., 2009b), l'ensemble des macrophages tissulaires dérive d'un même type cellulaire, le monocyte circulant, qui se différencie en macrophage spécialisé selon son microenvironnement tissulaire. Les expériences de transfert de moelle osseuse ont démontré qu'en situation physiologique, une sous-population de cellules sanguines dérivant de la moelle osseuse est capable de franchir la BHE et de participer au renouvellement de la microglie (Hickey et al., 1992). Dans ce contexte, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence l'origine monocytaire des cellules microgliales (Perry et al., 1985). In vitro, de multiples études ont démontré que des monocytes matures, lorsqu'ils sont mis en coculture avec des astrocytes, pouvaient se différencier en cellules microgliales présentant la même morphologie ramifiée (Leone et al., 2006). Ces études présentent un grand intérêt thérapeutique car dans un contexte où la BHE limite fortement les entrées dans le cerveau, ces cellules capables de la franchir aussi bien en conditions physiologiques qu'inflammatoires, pourraient être utilisées comme vecteurs cellulaires permettant de véhiculer un gène ou une molécule d'intérêt thérapeutique.

II. 1. b. α) ii) Morphologie et phénotype des cellules microgliales

Les cellules microgliales forment une population cellulaire très hétérogène. Les cellules microgliales présentent de grandes variations tant au plan morphologique que phénotypique. Selon son état d'activation, on distingue schématiquement deux types de microglie : la microglie quiescente et la microglie activée.

La microglie quiescente

La microglie quiescente, également appelée microglie ramifiée, équivaut à une forme mature, différenciée des cellules microgliales. Elle est de petite taille, parfois binucléée, avec un noyau dense, arrondi ou ovalaire, et présentant de nombreuses ramifications cytoplasmiques. Ces prolongements cytoplasmiques présentent eux-mêmes de multiples expansions extrêmement fines (spicules), qui confèrent aux cellules microgliales quiescentes leur aspect arborescent caractéristique (Rezaie et al., 2002).

Bien que les cellules microgliales soient présentes dans l'ensemble du SNC, il existe une distribution hétérogène de la microglie. En effet, on les retrouve en quantité plus abondantes dans la substance grise où les prolongements cytoplasmiques s'étendent dans toutes les directions. Au contraire, dans la substance blanche, les cellules microgliales sont moins abondantes, et leurs prolongements peuvent présenter une distribution bipolaire.

Le nom de microglie quiescente a été attribué à la microglie ramifiée car on a longtemps pensé qu'il s'agissait d'une cellule fonctionnellement "dormante". Récemment des travaux ont montré que les ramifications cytoplasmiques de la microglie quiescente sont très motiles, et explorent continuellement le microenvironnement de la cellule (Davalos et al., 2005) (Nimmerjahn et al., 2005) (Raivich, 2005).

Sur le plan phénotypique, la microglie quiescente, de par son appartenance au lignage myélomonocytaire, exprime un certain nombre de molécules membranaires présentes sur d'autres catégories de macrophages: le marqueur F4/80, le récepteur de la partie constante des immunoglobulines (FcR), la molécule lysosomiale CD68, ou encore le récepteur à la fraction iC3b du complément (CD11b).

En revanche, la microglie quiescente réprime un certain nombre de marqueurs de surface comme les molécules du CMH de classe I et II, les molécules de co-stimulation B7 et CD40 (nécessaire à la présentation antigénique), ainsi que les molécules impliquées dans les

processus de migration cellulaire, telles que les molécules d'adhésion ICAM et VCAM, de même que l'intégrine LFA1.

La microglie activée

C'est en condition pathologique que la microglie ramifiée peut se différencier en microglie amiboïde (activée). L'un des premiers signes caractérisant l'activation des cellules microgliales est la transformation **morphologique** en cellules microgliales amiboïdes dont la morphologie est commune à celle du macrophage activé. Cette transformation est progressive et permet de distinguer différentes étapes morphologiques. Lors d'une lésion, la microglie va d'abord se transformer en microglie dite hyper-ramifiée, caractérisée par une hypertrophie du corps cellulaire, un épaississement des prolongements proximaux et une réduction des ramifications distales. Ce type de microglie hyper-ramifiée est spontanément plus abondante dans le SNC de sujets âgés, l'activation des cellules microgliales augmentant progressivement avec l'âge (Streit et al., 1999). Dans la plupart des atteintes du SNC, la microglie hyper-ramifiée se transforme en microglie réactive. La microglie réactive poursuit sa transformation pour aboutir à la microglie amiboïde qui se distingue de la microglie réactive, par une réduction de taille, un aspect de cellule ronde, et une absence de ramifications cytoplasmiques (Streit et al., 1999). Parallèlement à cette transformation morphologique, l'activation des cellules microgliales s'accompagne d'une migration vers le site de lésion, de modifications phénotypiques et fonctionnelles (acquisition de capacités de présentations antigéniques en particulier). Par ailleurs, on observe une augmentation du nombre de cellules microgliales qui est liée à la prolifération de cellules microgliales, à la migration de cellules microgliales dérivant de zones intactes adjacentes à la lésion et/ou à l'infiltration de précurseurs microgliaux issus de la moelle osseuse (Ladeby et al., 2005).

L'activation des cellules microgliales est un phénomène qui intervient très précocement, en quelques minutes ou quelques heures en réponse à une atteinte du SNC. Selon le type de lésion et sa sévérité, l'activation affectera un périmètre plus ou moins important. On considère ainsi qu'en cas de lésion aiguë, la réponse microgliale atteint généralement un maximum 5 à 7 jours après le début de la lésion (Ladeby et al., 2005), puis s'atténue. Les mécanismes de "désactivation" des cellules microgliales sont mal définis. Dans le cas d'une réaction inflammatoire d'intensité restreinte, un retour progressif de la microglie hyper-ramifiée ou réactive en microglie quiescente semble intervenir. Par contre, dans le cas d'une réaction inflammatoire intense et/ou prolongée et notamment lorsqu'il y a une perte neuronale étendue,

la microglie amiboïde ne semble pas pouvoir revenir à état quiescent et évolue vers un processus de mort cellulaire par apoptose (Liu et al., 2001).

Sur le plan **phénotypique**, l'activation des cellules microgliales est caractérisée notamment par une augmentation d'expression des intégrines et des molécules d'adhésion (LFA1, VLA4, ICAM), qui ont un rôle important dans les processus de migration des cellules microgliales. Une augmentation d'expression de la molécule de co-stimulation B7 est également observée ainsi que des marqueurs CD11b et CD4. Le marqueur ED-1, présent sur la membrane lysosomale et témoin de l'activité phagocytaire, est lui aussi très fortement exprimé par la microglie activée, chez le rat. Cependant, les molécules du CMH constituent les marqueurs immunologiques reflétant le plus fidèlement l'activation microgliale. En effet, l'activation des cellules microgliales est caractérisée par une expression importante des molécules du CMH de classe I et II. Enfin, la molécule pan-leucocytaire CD45, qui est faiblement exprimée par les cellules microgliales quiescentes, permet de les différencier des macrophages infiltrés qui l'expriment très fortement (Carson et al., 1998).

II. 1. b. a) iii) Des fonctions variées

En réponse à une lésion de SNC, la microglie va s'activer très rapidement et subir des modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles importantes. L'activation des cellules microgliales n'intervient pas seulement en cas de modification de l'intégrité structurale du SNC mais également lors d'altérations très fines de leur microenvironnement tel qu'un déséquilibre de l'homéostasie ionique (Gehrmann et al., 1993). La microglie exprime également un grand nombre de récepteurs permettant de recevoir des signaux d'ordre immunitaire au sein du SNC : récepteurs aux cytokines, récepteurs aux fractions du complément et récepteurs de reconnaissance des molécules associées aux pathogènes (Pattern Recognition Receptors, PRP) (Aloisi, 2001).

Ainsi, on considère actuellement qu'au sein du SNC adulte, toute perturbation de l'homéostasie cérébrale est susceptible d'induire une activation rapide des cellules microgliales. L'intensité de cette réponse microgliale est graduée et peut conduire à des modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles majeures.

Phagocytose

De nombreuses études *in vivo* ont démontré l'activité de phagocytose des cellules microgliales activées (Streit et al., 1988). Lors de la première phase du processus de phagocytose, les particules ou microorganismes adhèrent à la membrane de la cellule, soit par des récepteurs non spécifiques, tels que les récepteurs de type lectine, soit par des récepteurs spécifiques pour les opsonines (immunoglobulines (Igs) ou fraction de complément recouvrant un micro-organisme, une cellule ou une particule) comme le récepteur Fc (récepteur à la fraction constante des Igs) et les récepteurs aux compléments (CR1, CR3, CR4).

L'activation des cellules microgliales s'accompagne d'une augmentation d'expression des récepteurs opsoniques (Aloisi, 2001). En effet, les récepteurs à la partie constante des IgG tels que FcγRI, II et III sont fortement exprimés par la microglie amiboïde ; de même que les récepteurs au complément CR1, CR3 (CD11b) et CR4. Le récepteur au complément CR3 est l'un des marqueurs les plus précocement augmentés lors de l'activation microgliale et son augmentation a été mise en évidence dans de nombreuses situations pathologiques. Notons également qu'une étude relève des différences de capacités de phagocytose entre microglie et autres macrophages tissulaires : les cellules microgliales seraient capables de phagocyter des particules de taille élevée alors que les autres macrophages fragmentent préalablement ces particules avant de les internaliser (Smith, 2001).

Présentation d'antigènes

La présentation antigénique est un mécanisme clé de la réponse des cellules T dirigée contre les agents infectieux ou les cellules tumorales. Cette présentation antigénique requiert l'interaction entre le récepteur des lymphocytes T (TCR) et l'antigène cible associé aux molécules du CMH à la surface de la cellule présentatrice d'antigènes (CPA).

Parallèlement à la liaison du TCR aux molécules du CMH, des interactions additionnelles interviennent entre molécules d'adhésion (LFA-1, LFA-3, ICAM-1) et molécules de co-stimulation (CD40, B7-1, B7-2) exprimées par les CPA et les cellules T. Ces interactions sont nécessaires à une adhésion optimale CPA-lymphocyte T et une activation complète des lymphocytes T.

Le SNC est dépourvu de CPA intra-parenchymateuses et les cellules microgliales quiescentes n'expriment pas les molécules du CMH en condition physiologique. En cas de lésion du SNC,

l'activation microgliale est caractérisée par l'expression des molécules du CMH de classe I et II ainsi que des molécules de co-stimulation et d'adhésion. Ces modifications phénotypiques s'accompagnent probablement d'une acquisition des fonctions de présentation antigénique par la microglie activée.

Synthèse de médiateurs de l'immunité

- Les cytokines

Elles jouent un rôle très important dans la modulation de l'inflammation et le contrôle de la réponse immune. Dans le SNC, la microglie a été identifiée, avec les astrocytes, comme étant l'une des principales sources de cytokines.

L'IL-1 et le TNF- α sont les principales cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules microgliales (Nadeau and Rivest, 2000). Elles sont impliquées dans le développement de l'inflammation du SNC notamment par leur capacité à induire l'expression de molécules d'adhésion et la synthèse de chimiokines par les cellules endothéliales et les astrocytes environnants, facilitant ainsi l'extravasation et le recrutement des leucocytes au sein du SNC (Engelhardt and Ransohoff, 2005).

La microglie sécrète notamment de l'IL-6 (Frei et al., 1989), cytokine pro-inflammatoire agissant sur la croissance et la différenciation des lymphocytes B. De nombreuses études se sont focalisées sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules microgliales. Mais ces dernières jouent également un rôle dans la modulation négative de l'inflammation par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β , l'IL-10 et l'IL-1ra (antagoniste au récepteur de l'IL-1) (Kiefer et al., 1998) (Jander et al., 1998).

- Les chimiokines

Les chimiokines (4 sous-familles : CXC, CC, C et CX3C) sont des petites cytokines (8 à 10 kDa) qui interagissent avec des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G et exprimés à la surface de nombreuses cellules. Les cellules microgliales produisent les chimiokines des sous-familles CXC (IL-8, IP-10) et CC (MIP-1 α , MIP-1 β ,

MCP-1, RANTES) (Aloisi, 2001) susceptibles de contribuer au recrutement des lymphocytes T, des macrophages et des cellules dendritiques au sein du SNC.

- Les prostanoides

Les prostaglandines et les thromboxanes, regroupés sous le nom de prostanoides sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique via la voie de la cyclooxygénase (COX). Ce sont d'importants régulateurs de l'inflammation. Des expériences *in vitro* ont permis de mettre en évidence la production de prostaglandine D₂ (PGD₂), prostaglandine E₂ (PGE₂) et thromboxane B₂ par la microglie (Aloisi et al., 2000). La sécrétion de PGE₂ par les cellules microgliales a également été démontrée au cours de maladies inflammatoires du SNC (Khoury et al., 1992).

- Molécules cytotoxiques

Les cellules microgliales activées peuvent également libérer diverses molécules cytotoxiques comme du NO, des protéases, des acides aminés neurotoxiques, de l'acide quinolinique. De même, les radicaux libres oxygénés tels que le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont neurotoxiques comme montré par des expériences de co-cultures neurones/microglie (Kreutzberg, 1996).

- Molécules neurotrophiques

L'ensemble des données décrites ci-dessus, notamment l'expression microgliale de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et de molécules neurotoxiques, suggère que la microglie participe à la formation de lésions tissulaires au cours de nombreuses maladies neurologiques. Cependant, les cellules microgliales produisent également un ensemble de molécules neurotrophiques impliquées dans la survie neuronale et/ou oligodendrocytaire. C'est le cas notamment du NGF (Nerve Growth Factor) (Mallat et al., 1989), du NT3 (Neurotrophine-3) (Elkabes et al., 1996), et du BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor). Une étude a démontré que chez la souris, les cellules microgliales sécrétaient des facteurs solubles non identifiés, induisant la migration et la différenciation de précurseurs neuronaux (Aarum et al., 2003).

II. 1 . b. β) Les autres phagocytes mononucléés résidents du SNC

II. 1. b. β) i) Les cellules périvasculaires ou cellules de Mato

Ces cellules représentent une minorité cellulaire au sein du SNC et sont localisées dans un dédoublement de la lame basale des capillaires cérébraux. Sur le plan phénotypique, les cellules périvasculaires se distinguent de la microglie parenchymateuse juxtavasculaire par l'expression constitutive de molécules CMH classe II et de la molécule ED2 (Kreutzberg, 1996). Les cellules périvasculaires expriment de façon inductible *in vivo* les molécules de co-stimulation (B7) et d'activation (CD40) qui leur donnent la capacité de présenter efficacement l'antigène aux lymphocytes T en situation inflammatoire. Par ailleurs, les cellules périvasculaires sont douées, à l'état basal, d'une grande capacité de phagocytose vis-à-vis de particules d'antigènes et d'antigènes contenus dans le liquide interstitiel du parenchyme nerveux.

II. 1. b. β) ii) Les macrophages et cellules dendritiques associés aux méninges et aux plexus choroïdes

Les cellules dendritiques (DCs) sont considérées comme les cellules présentatrices d'antigène (CPA) par excellence, car seules capables d'induire la prolifération de lymphocytes T naïfs. Le parenchyme nerveux est l'un des seuls sites anatomiques où l'on ne détecte pas de DCs. Toutefois, autour du SNC normal, des DCs sont détectables en immunohistochimie et sont localisées "stratégiquement" à l'extérieur du parenchyme nerveux, aux points d'entrée potentiels des pathogènes, c'est-à-dire les méninges et les plexus choroïdes (PCs) (Serot et al., 2000).

- Macrophages et DCs associés aux plexus choroïdes (PC) :

Les PCs sont des structures d'aspect villositaire appendues à la paroi des ventricules cérébraux et dont un des rôles est de synthétiser le LCR. Les PCs sont constitués d'un stroma conjonctivo-vasculaire entouré d'un épithélium formé de cellules épendymaires, spécialisées et réunies par des jonctions serrées. Le stroma des PCs contient des vaisseaux fenestrés (à la différence des capillaires cérébraux qui sont non fenestrés), des fibroblastes et des phagocytes mononucléés qui expriment des marqueurs macrophagiques ou de cellules dendritiques. Par ailleurs, des macrophages dits épiplexuels, encore appelés cellules de Kolmer, sont localisés sur le versant apical de l'épithélium des PCs, au contact du LCR (Ling et al., 1998). Enfin, une dernière catégorie de macrophages associés aux PCs est constituée par les macrophages flottants ("free floating macrophages") qui peuvent être observés dans le LCR des ventricules cérébraux.

- Macrophages et DCs associés aux méninges :

Les méninges sont formées de trois tuniques de tissu conjonctif richement vascularisé entourant l'ensemble du névraxe. La pie-mère est la tunique méningée la plus interne adhérant au parenchyme nerveux, la dure-mère est la tunique méningée la plus externe adhérant au tissu osseux, et l'arachnoïde est la tunique méningée centrale, formée de travées entre lesquelles circule du LCR. Les trois tuniques méningées accueillent un riche réseau de macrophages et de cellules dendritiques qui sont le plus souvent au contact du LCR.

II. 2) Dynamique de la réaction phagocytaire mononucléé

II. 2. a) Les méthodes d'étude de cette réaction phagocytaire et leurs limites

Deux types cellulaires appartenant au système des phagocytaires mononucléés participent à la physiopathologie de l'ischémie cérébrale : les cellules microgliales et les macrophages inflammatoires infiltrant le parenchyme nerveux. Il n'y a pas de marqueur immunologique permettant de distinguer ces deux types cellulaires. Par ailleurs, les critères morphologiques sont peu discriminants car certains macrophages dérivant du sang sont capables d'adopter une morphologie ramifiée microglial-like en situation pathologique (Simard et al., 2006) (Turrin et al., 2007). La distinction entre activation/prolifération microgliale et recrutement intracérébral de macrophages inflammatoires fait donc nécessairement appel à des expériences de transfert de moelle osseuse dans lesquelles des animaux irradiés sont reconstitués avec de la moelle osseuse hématopoïétique dérivant d'animaux transgéniques GFP+ (animaux dont l'ensemble des cellules expriment la molécule fluorescente GFP sous contrôle du promoteur de l'actine) (Turrin et al., 2007). Dans ces expériences, les animaux irradiés/reconstitués sont ensuite soumis à une ischémie cérébrale expérimentale et l'analyse des cellules myéloïdes du cerveau permet de distinguer les macrophages dérivant du sang (GFP+) des cellules microgliales résidentes (GFP-). Dans ces conditions particulières, en partie biaisées par la procédure d'irradiation des animaux receveurs (Mildner et al., 2007) (Davoust et al., 2008), différentes études ont permis d'établir la cinétique et les mécanismes d'entrée des macrophages dans le parenchyme, en utilisant différents modèles d'ischémie expérimentale.

D'autres équipes ont parallèlement développé d'autres stratagèmes expérimentaux, utilisant notamment des déplétions périphériques des macrophages, pour permettre d'évaluer la cinétique et le rôle respectif des deux populations phagocytaires dans la réponse post-ischémique (Schroeter et al., 1997).

II. 2. b) Description de la réaction phagocytaire mononuclée centrale

II. 2. b. a) Accumulation et d'une activation microgliale

Une augmentation focale de la densité de cellules microgliales activées au sein du tissu cérébral ischémié a été montrée dans des modèles *in vitro* utilisant des cultures organotypiques d'hippocampe, dans lesquels toute infiltration par des macrophages dérivés du sang est forcément impossible (Skibo et al., 2000). Nous verrons que ce modèle sur tranche hippocampique est le seul modèle d'ischémie permettant l'étude isolée de la survie et de l'accumulation de la population microgliale résidente impliquées dans la réaction post-ischémique (cf objectif 2). Dans cette étude (Skibo et al., 2000), l'augmentation de la densité microgliale dans ce modèle *in vitro* d'hypoxie hippocampique est localisée à la couche pyramidale du CA1 et est associée à des modifications structurelles des cellules microgliales qui adoptent une morphologie activée amiboïde (Skibo et al., 2000). Dans des modèles *in vivo* d'ischémie cérébrale focale (Olson and McKeon, 2004) et globale (Pforte et al., 2005) une activation et augmentation précoce de la densité de cellules phagocytaires activées a été décrite comme une accumulation microgliale, sous réserve des limitations techniques précédemment décrites empêchant de distinguer formellement microglie résidente et macrophages infiltrant. Des études récentes utilisant des techniques de cytométrie de flux couplée à l'immunohistochimie (Gelderblom et al., 2009) ou de PCR quantitative couplée à des western blot (Lambertsen et al., 2007), ont clairement confirmé cette accumulation post-ischémique précoce de cellules macrophagiques activées mais sans distinguer la participation de la microglie résidente de celle des macrophages dérivés du sang.

On notera que si cette activation microgliale a été en général décrite comme intense et précoce dans des modèles d'ischémie focale, ce n'est pas forcément systématiquement le cas au cours des ischémies globales. En effet, des activations microgliales différées (au 4^{ème} jour post-ischémie) et très localisées à la couche pyramidale du CA1 ont été rapportées dans des modèles de BCAO chez le Rat (Bendel et al., 2005; Stephenson et al., 1995).

II. 2. b. β) Recrutement de macrophages dérivés du sang

Les approches précédemment décrites, permettant de contourner le problème de distinction entre les deux populations macrophagiques (résidentes versus infiltrantes). Elles ont en partie permis de distinguer les composantes de la dynamique phagocytaire en révélant une réponse microgliale précoce précédant le recrutement de macrophages périphériques.

En effet, Schroeter et al. (Schroeter et al., 1997) ont réalisé une déplétion des macrophages périphériques puis examiné la réponse phagocytaire par immunomarquage ED1 dans un modèle murin de photothrombose. Au 3^{ème} jour post-ischémie, ces auteurs n'ont pas constaté de différence du marquage phagocytaire entre les souris déplétées en macrophages périphériques et les souris également ischémisées mais non déplétées. Par contre, dès le 6^{ème} jour, le marquage était plus important chez les souris non déplétées en macrophages périphériques. Dans ce modèle d'ischémie focale, la réponse phagocytaire précoce semble donc être plutôt microgliale et la réponse retardée impliquerait les macrophages circulants. Une autre équipe (Schilling et al., 2003) a utilisé des souris chimériques caractérisées par le marquage à la GFP (green fluorescent protein) de ses macrophages périphériques. Ces macrophages périphériques GFP+ n'étaient retrouvés au sein du tissu cérébral ischémisé qu'à partir 4^{ème} jour (J4) post-ischémie dans un modèle d'ischémie transitoire (tMCAO), avec un pic à J7. Entre J4 et J7, une grande majorité des cellules phagocytaires, était GFP- donc probablement microgliale. Cette activation microgliale semble être très précoce, puisqu'elle a été décrite en périphérie de l'infarctus dès la 30^{ème} minute post-ischémie, dans un modèle d'ischémie permanente (pMCAO) réalisé également chez des souris chimériques (Rupalla et al., 1998).

II. 2. b. γ) Description de la dynamique spatio-temporelle de la réponse phagocytaire

Plusieurs équipes ont tenté de décrire le pattern spatio-temporel de cette activation phagocytaire dans les premières heures post-ischémie, en l'absence de moyens expérimentaux permettant de distinguer formellement la composante microgliale (résidente) des macrophages dérivés du sang. Nous respecterons dans l'énoncé de leurs résultats la désignation (microglie ou macrophages) utilisée par les auteurs, mais avec les réserves évoquées. Zhang et al. (Zhang et al., 1997), dans un modèle d'occlusion transitoire (tMCAO) chez le rat, ont ainsi décrit une

infiltration progressive de cellules microgliales activées (amiboïdes) de la lésion ischémique entre 2 et 10 heures post-ischémie, atteignant un maximum en concentration au coeur de l'infarctus à 22h post-ischémie. Ces cellules microgliales activées sont absentes de la lésion 1h après reperfusion alors qu'elles sont présentes en zone périlésionnelle. Dans les régions adjacentes et à distance de la lésion les cellules microgliales sont également présentes précocément mais conservent un aspect ramifié. Des résultats similaires ont été obtenus par Lehrmann et al. (Lehrmann et al., 1997) dans un modèle identique d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (tMCAO) chez le rat. L'infiltration massive mais retardée (> 24h) du caudo-putamen nécrotique par des phagocytes contrastait avec le recrutement et l'activation précoces des cellules microgliales en zone périlésionnelle, désignée par les auteurs sous le terme de "pénombre".

Si l'activation phagocytaire post-ischémique est précoce, elle n'est pas pour autant éphémère. En effet, Ekdahl et al. (Ekdahl et al., 2003) ont décrits dans un modèle d'ischémie transitoire (tMCAO) chez le rat, une augmentation prolongée de la densité de microglie activée dans le tissu lésé jusqu'à 16 semaines après une occlusion de 2 heures de l'artère cérébrale moyenne. L'équipe de Lalancette-Hébert a également détecté des cellules microgliales activées plusieurs mois après une ischémie transitoire ayant duré 1 heure (Cordeau et al., 2008). Ces constatations en faveur d'une prolongation de cette réaction inflammatoire phagocytaire au-delà de la phase aiguë et subaiguë post-ischémique, rendent "temporellement" compatible sa participation éventuelle à des mécanismes tardifs de cicatrisation et de réparation.

Les cellules dendritiques (DCs) qui appartiennent au système des phagocytes mononuclées (cf § 2^{ème} partie II) D), participent également à la réaction inflammatoire post-ischémique. Une accumulation de DC dès le premier jour post-ischémie a en effet été constaté par cytométrie de flux dans l'hémisphère ischémié dans un modèle d'ischémie transitoire (Gelderblom et al., 2009). Cette population infiltrante était d'origine myéloïde, issue de monocytes circulants, car présentant une forte expression du marqueur CD11b. Ces cellules présentatrices d'antigènes par excellence surexpriment les molécules du CMH II et pourraient être impliquées dans le contrôle de l'activation immunitaire et les processus de tolérance (Steinman and Banchereau, 2007).

II. 2. b. δ) Arguments en faveur d'une prolifération microgliale

L'accumulation post-ischémique de cellules microgliales dans un modèle d'ischémie globale, est en partie secondaire à une prolifération cellulaire (Pforte et al., 2005). Cette prolifération

microgliale est également retrouvée dans des modèles d'ischémie focale (Denes et al., 2007; Lalancette-Hebert et al., 2007). Cette dernière équipe a réalisé le modèle de tMCAO chez des souris chimériques (caractérisée par des macrophages périphériques GFP+), cette approche permet d'affirmer que la population phagocytaire proliférante est bien résidente donc microgliale (Lalancette-Hebert et al., 2007).

De façon (très) intéressante, Denes et al. ont montré que cette accumulation/prolifération microgliale était non seulement hétérogène au sein de l'hémisphère ischémié mais surtout variable en fonction de la durée et de l'intensité de l'ischémie (Denes et al., 2007). Ainsi, la prolifération microgliale apparaît inversement corrélée à la taille des lésions en cas d'ischémie relativement peu sévère (tMCAO de 30 min). Ce résultat suggère un effet protecteur de la prolifération microgliale. En revanche les résultats sont très différents lors d'une ischémie intense (60 min de tMCAO) où une perte microgliale majeure est observée.

II. 2. b. ε) Arguments en faveur d'une souffrance et perte microgliale en cas ischémie sévère

En cas d'ischémie sévère, Denes et al. (Denes et al., 2007) ont non seulement constaté qu'au sein de la lésion le nombre de cellules microgliales 4 heures post-ischémie diminuait, mais qu'il n'existait plus à 24h d'augmentation de la densité microgliale au sein du cortex ischémié comme celle décrite pour des lésions moins sévères. Cette constatation d'une baisse précoce de la densité microgliale au sein des lésions ischémiques très sévères suggère, qu'au moins dans certaines conditions, les cellules microgliales pourraient subir des dommages ischémiques et/ou migrer vers des régions adjacentes moins lésées. Il existe d'autres arguments expérimentaux en faveur de l'existence d'une perte microgliale secondaire à l'ischémie. En effet, une mort microgliale différée a été constatée au sein de la lésion par immunohistochimie et méthode TUNEL (détection des cellules en apoptose) dans des modèles d'ischémie focale transitoire (tMCAO) (Kato et al., 1996), permanente (pMCAO) (Mabuchi et al., 2000) et d'ischémie globale (BCAO) (Petito et al., 1998) chez le rat. Des expressions microgliales précoces de caspases, enzymes de la cascade apoptotique, ont également été à plusieurs reprises rapportées au sein de lésions cérébrales ischémiques dans divers modèles animaux. Bhat et al. ont ainsi montré une expression de la caspase-1 microgliale dans les hippocampes ischémiés de gerbille ayant subi une ischémie globale transitoire (BCAO) (Bhat et al., 1996). Velier et al. ont montré l'expression également précoce de la caspase-3 active par des cellules microgliales atrophiques au sein de la lésion corticale induite par électrocoagulation de l'artère cérébrale moyenne chez le rat (pMCAO) (Velier et al., 1999).

De même, Lambertsen et al. ont rapporté une expression précoce identique de la caspase-3 par des cellules microgliales dans un modèle d'ischémie permanente chez la souris (Lambertsen et al., 2009). Chez l'homme, une expression microgliale/macrophagique de la caspase-3 a également été montrée au sein des lésions ischémiques cérébrales consécutives à un arrêt cardiorespiratoire (hypoxie globale) (Love et al., 2000).

Une souffrance microgliale révélée par l'expression de la protéine de stress (heat shock protein) HSP 70 a également été rapportée 24 heures après ischémie globale chez le rat (Gasparly et al., 1995). De même, des dommages oxydatifs sans apoptose ont été mis en évidence au sein de cellules microgliales après ischémie focale transitoire (tMCAO) (Matsuda et al., 2009).

Ces données pondèrent l'idée d'une ischémie cérébrale impliquant nécessairement une accumulation et une activation de la microglie. Les cellules microgliales apparaissent en effet directement sensibles et réactives à l'ischémie. Cette sensibilité a été montrée in vitro par exposition de cultures primaires microgliales à une OGD (oxygen- glucose déprivation) (Chock and Giffard, 2005) (Lyons and Kettenmann, 1998). In vivo, cette sensibilité microgliale à l'ischémie apparaît directe et indépendante, au moins partiellement, de la perte neuronale secondaire à une ischémie globale chez le rat (Sugawara et al., 2002).

II. 2. c) Immunosuppression périphérique et implication des monocytes circulants

Les lésions ischémiques cérébrales sont à l'origine de modifications rapides des conditions immunitaires systémiques : changements de la proportion des cellules inflammatoires circulantes, des taux sériques des médiateurs immunitaires et de la composition cellulaire et moléculaire des organes lymphoïdes systémiques (Offner et al., 2006a; Offner et al., 2009). Chez les patients, la protéine C réactive (CRP), la concentration sanguine en leucocytes (Ross et al., 2007) et les taux plasmatiques d'IL-6 sont ainsi augmentés dès l'admission et jusqu'au 7^{ème} jour post-AVC (Emsley et al., 2003). Cette atteinte immunitaire périphérique est rendue responsable de l'augmentation de la sensibilité (et donc de la morbi-mortalité) liée aux infections en post-AVC (Prass et al., 2003) (Chamorro et al., 2007). Selon Offner et al (Offner et al., 2009), l'infarctus cérébral entraînerait ces changements des conditions immunitaires systémiques via la diffusion systémique des cytokines et chimiokines sécrétées par la réaction neuro-inflammatoire post-ischémique (Allan and Rothwell, 2003) (del Zoppo et al., 2001) et la diffusion dans le sang d'antigènes inflammatoires issus de la dégradation des constituants cérébraux au cours de l'ischémie (Offner et al., 2009).

Dans les modèles animaux d'ischémie cérébrale, une réduction du nombre de cellules immunes dans les organes lymphoïdes périphériques a été vérifiée. Cette atteinte périphérique du système immunitaire se traduit macroscopiquement par une réduction de la taille de la rate et du thymus, consécutive à une diminution du nombre des splénocytes et thymocytes (Offner et al., 2006b), contrastant avec une augmentation parallèle du contingent cellulaire circulant. Cette dernière semble donc se faire aux dépens des populations thymiques et spléniques. En effet, pour les cellules de la lignée myéloïde, une augmentation du pourcentage des macrophages/monocytes CD11b dans le sang périphérique a clairement été montrée après une ischémie cérébrale expérimentale chez la souris. Ces cellules monocytaires circulantes sont viables, mais de façon intéressante elles n'expriment par l'intégrine VLA-4 qui leur permettrait d'infiltrer notamment le tissu cérébral ischémié (Offner et al., 2006b). Cette constatation amène à envisager que ces cellules précurseuses puissent jouer un rôle « par elles-même », depuis le compartiment vasculaire périphérique circulant.

Le rôle précis de cette population monocyttaire CD11b dans l'immunodépression post-AVC n'est pas clairement élucidé. Certaines de ces cellules sanguines mononuclées CD11b sont des cellules dendritiques, qui potentiellement pourraient activer les lymphocytes T régulateurs et ainsi réduire le niveau d'activation des cellules T effectrices (Polanczyk et al., 2006)(cf § III) 1) c). Chamorro et al. ont également montré que la sécrétion cytokinique de ces monocytes circulant, dont le nombre est augmenté dans le sang des patients présentant un AVC, était caractérisée par un profil de type anti-inflammatoire, avec notamment une sécrétion accrue d'IL-10 (Chamorro et al., 2006), qui pourrait rendre compte de l'augmentation de la sensibilité aux infections cliniquement rapportée (Chamorro et al., 2007). Une analyse par transcriptome réalisée sur des monocytes circulants humains exposés *in vitro* à une hypoxie a mis en évidence une modification du pattern d'expression des gènes des chimiokines et molécules d'adhésion. Ces modifications induites par l'hypoxie pourraient contribuer à promouvoir le recrutement tissulaire de certaines sous-populations leucocytaires au cours de situations pathologiques à composante inflammatoire, où co-existent des conditions hypoxiques systémiques, comme par exemple le cas d'une hypoxie cérébrale globale due à une défaillance cardio-respiratoire (Bosco et al., 2006).

De nouvelles perspectives ont été récemment offertes par la caractérisation de sous-populations fonctionnelles hétérogènes de monocytes circulant en condition homéostasiques versus inflammatoires (Auffray et al., 2009b). Cette dichotomie entre des profils homéostasiques et pro-inflammatoires n'est pas sans rappeler celle des programmes d'activations macrophagiques (classiques M1 et alternatives M2) décrits § II. 1) b) γ), et ce

d'autant plus qu'il existe des arguments en faveur d'une filiation entre ces sous-populations monocytaires phénotypiquement différenciées ((Ly6C+(Gr1+) versus Ly6C-(Gr1-) chez la souris) et les macrophages M1 et M2 en condition inflammatoire (Auffray et al., 2007) (Auffray et al., 2009b). Ces données sont prometteuses. A notre connaissance, aucune étude ne rapporte de données expérimentales spécifiques concernant la cinétique d'expression des cytokines M1 versus M2 dans des modèles d'ischémie cérébrale.

II. 3) Le rôle ambivalent de la réponse microgliale post-ischémique

Si la question du rôle bénéfique ou délétère de la réaction inflammatoire au cours de l'ischémie cérébrale n'a pas encore trouvé de réponse univoque (cf § 2^{ème} partie I 1)), celle des conséquences de l'activation de son principal effecteur, la cellule phagocytaire mononuclée, est naturellement sujet à controverses. Les résultats expérimentaux sont conflictuels. Les arguments expérimentaux plaidant pour un effet délétère ou bénéfique seront décrits successivement. Ainsi la conception de cellules microgliales et macrophagiques exerçant essentiellement une activité phagocytaire d'élimination des débris cellulaires et apoptotiques (Schilling et al., 2005), est dépassée. Les données expérimentales, reflètent certainement la diversité des mécanismes moléculaires régulant l'activation et la réponse microgliale.

II. 3. a) Effets néfastes

Dans des modèles d'ischémie focale chez le rongeur, l'administration de molécules anti-inflammatoires, comme les antibiotiques de la famille des tétracyclines, ciblant a priori la cellule microgliale activée, a clairement montré un effet neuroprotecteur (Yrjanheikki et al., 1998; Yrjanheikki et al., 1999) (Arvin et al., 2002) (Weng and Kriz, 2007). Cependant, le mécanisme de l'effet neuroprotecteur de la minocycline reste incertain et pourrait être indépendant d'une inhibition de la microglie, en rapport avec un mécanisme de déclenchement de l'apoptose neuronale (Friedlander, 2003). Néanmoins, une étude récente, dans un modèle de lésion cérébrale traumatique, a montré que la baisse de volume lésionnel après administration de minocycline n'était pas liée à une augmentation de cellules

apoptotiques mais à une diminution de l'activation microgliale et de la production d'interleukine-1 β (Bye et al., 2007).

La microglie représente en effet une source majeure de cytokines pro-inflammatoires (cf § I 3)) telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α (Vila et al., 2000) (Relton et al., 1996) (Beamer et al., 1995) (Barone et al., 1997a), qui sont considérées comme les principaux médiateurs de la mort neuronale différée post-ischémique (pour revue (Lai and Todd, 2006). L'effet de certaines de ces cytokines pro-inflammatoires n'est pas formellement défini. C'est le cas de l'IL-6 dont la suppression n'est pas assortie d'un effet neuroprotecteur (Clark et al., 2000). L'expression microgliale de TNF est neuroprotectrice via l'activation du récepteur p55R dans un modèle d'ischémie permanente, comme l'ont montré élégamment Lambertsen et al., en utilisant des souris chimériques (KO pour le gène du TNF greffées avec de la moelle osseuse sauvage) (Lambertsen et al., 2009).

Outre leur activité phagocytaire et cette synthèse de cytokines, la microglie activée sécrète de nombreuses molécules cytotoxiques, pouvant participer aux dommages ischémiques : radicaux libres, oxyde nitrique (NO), glutamate (Giulian et al., 1993) (Block et al., 2007) (Kaushal and Schlichter, 2008).

L'activation des cellules microgliales par des médiateurs inflammatoires leur confère des propriétés neurotoxiques largement mises en évidence dans divers modèles (Arai et al., 2004) (Minghetti et al., 2004; Qin et al., 2004) (Huang et al., 2005) (Fordyce et al., 2005). Ces travaux ont très souvent utilisé des expositions à des substances d'origine microbienne (bactériennes ou virales) pour activer les cellules microgliales. Le lipopolysaccharide (LPS), ou d'autres particules virales, sont bien connus pour induire une réaction immunitaire massive à médiation cellulaire, via la mise en jeu du système des Toll-like récepteurs (TLRs) (Kawai and Akira, 2006). Une étude récente a effectivement montré qu'au cours des processus inflammatoires post-ischémiques, phénomènes stériles, les voies d'activation des TLR étaient également mises en jeu et responsables d'une aggravation des lésions (Lehnardt et al., 2007). Néanmoins, la nature du stimulus (endogène versus microbien) semble être cruciale (Tang et al., 2007), car sélectionnant le récepteur Toll-like par lequel la voie de signalisation va être activée. Pour certains auteurs, ce mode d'activation du système des TLR conditionnerait l'effet neurotoxique versus neuroprotecteur de l'activation microgliale (Marsh et al., 2009; Ziegler et al., 2007).

II. 3. b) Effets bénéfiques

De nombreux arguments plaident en effet pour un rôle bénéfique de la microglie, au moins dans certaines conditions post-ischémiques expérimentales. Ainsi, l'injection intraventriculaire de cellules microgliales exogènes dans un modèle murin d'ischémie focale transitoire s'est avérée neuroprotectrice (Kitamura et al., 2004) et bénéfique sur le plan de la récupération fonctionnelle post-ischémique (Kitamura et al., 2005). De même, des injections intra-artérielles de cellules microgliales se sont révélées neuroprotectrices dans des modèles d'ischémie globale (Hayashi et al., 2006; Imai et al., 2007). Au contraire, une déplétion immuno-toxique de la microglie hippocampique au cours d'une ischémie globale aggrave les dommages ischémiques neuronaux (Montero et al., 2009). Des effets bénéfiques de traitement par facteurs de croissance de la lignée myéloïde, à savoir le GM-CSF (granulocytes-macrophage colony stimulating factor) et MCSF (macrophage colony stimulating factor) ont été observés au cours d'ischémie cérébrale expérimentale dans de modèles murins (Lalancette-Hebert et al., 2007) (Schabitz et al., 2003)

L'équipe de Lalancette-Hébert a également montré dans un modèle murin d'ischémie transitoire que la prolifération d'une sous-population de cellules microgliales résidentes exerçait un effet neuroprotecteur, supprimé par une chimiothérapie sélective anti-proliférative (Lalancette-Hebert et al., 2007). Ces résultats sont apparemment contradictoires avec ceux d'une étude récente ayant montré *in vitro* et *in vivo* chez le rat que la modulation de la prolifération microgliale était au contraire neuroprotectrice et associée à une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires délétères (Zhang et al., 2009). Dans ces deux études, les modalités de modulation de la prolifération microgliale sont très différentes puisque l'utilisation de l'inhibiteur non sélectif du cycle cellulaire est administré avant l'ischémie par l'équipe de Zhang et al., alors que l'ablation sélective de la population microgliale (thymidine kinases-cd11b⁺) par injection du ganciclovir (substrat de la kinase létale) est réalisée après l'ischémie par Lalancette-Hébert et al. Le caractère *a priori* contradictoire de ces résultats reflète probablement la complexité et l'ambivalence de la réponse microgliale. D'autres études *in vitro* ont confirmé le rôle neuroprotecteur en condition post-ischémique de la microglie activée. Il s'agit des travaux de Neumann et al. qui utilisent un modèle *in vitro* d'OGD (oxygen-glucose deprivation) sur des cultures organotypiques d'hippocampe de souris. L'adjonction en post-hypoxie de cultures cellulaires microgliales diminuent la perte neuronale (Neumann et al., 2006). L'étude des interactions cellulaires entre les cellules microgliales et le tissu cérébral ischémié a révélé qu'un effet neuroprotecteur de la microglie résidente était lié à leur activité de phagocytose des polynucléaires infiltrants. Cette activité phagocytaire dirigée contre les polynucléaires notoirement neurotoxiques en condition

post-ischémique avait été signalée par d'autres auteurs (Denes et al., 2007; Weston et al., 2007). Ce mécanisme pourrait effectivement représenter une fonction neuroprotectrice microgliale importante.

Un argument majeur de l'effet potentiellement bénéfique de la microglie est sa capacité de production de facteurs de croissance, l'impliquant d'emblée dans les processus régénératifs (Kriz and Lalancette-Hebert, 2009) et pour revue (Hanisch and Kettenmann, 2007)). La microglie est notamment une source de BDNF (brain derived neurotrophic factor) (Miwa et al., 1997) (Nakajima and Kohsaka, 2004) (Batchelor et al., 1999). L'injection de cellules microgliales exogènes après hypoxie globale réalisée chez la Gerbille est associée à une augmentation du taux cérébral de BDNF (Imai et al., 2007). L'IGF1 est une autre neurotrophine produite par la microglie résidente proliférant en post-ischémie (Lalancette-Hebert et al., 2007) (O'Donnell et al., 2002). Récemment, une sécrétion de galectin-3 par la microglie activée après une ischémie focale transitoire chez le rat a été également mise en évidence (Yan et al., 2009). Il s'agit d'une protéine impliquée dans les processus d'angiogénèse et de neurogénèse, dont la sécrétion par les cellules gliales en condition post-ischémique suggère leurs implications dans des processus de réparation. Tonchev et al. ont récemment montré dans un modèle d'ischémie globale transitoire chez le Singe adulte que cette sécrétion de neurotrophines par les cellules microgliales, effectrices de la réaction inflammatoire post-ischémique, était associée à l'expression post-ischémique de leurs récepteurs par les cellules pyramidales hippocampiques (Tonchev et al., 2008). Ces résultats suggèrent que l'activation et la prolifération des cellules microgliales pourraient jouer un rôle important dans les mécanismes de neuroplasticité post-ischémique via la sécrétion de molécules neurotropiques. Un autre argument en faveur du rôle potentiel de la microglie dans les processus de neuroplasticité est apporté par les observations de Wake et al. Ces auteurs ont en effet constaté une modification des contacts entre prolongement microglial et synapses après ischémie, et suggèrent que les cellules microgliales participeraient activement à l'élimination des connections synaptiques au cours de l'ischémie cérébrale (Wake et al., 2009).

Une piste pour réconcilier ces données apparemment contradictoires sur le rôle de la microglie au cours de l'ischémie cérébrale est peut être apportée par Lai and Todd (Lai and Todd, 2006). Leur hypothèse est en effet que la sévérité de l'atteinte neuronale pourrait conditionner le caractère bénéfique ou délétère de la participation microgliale, à travers un dialogue étroit entre les deux populations cellulaires exposées à l'ischémie. Les voies de

signalisations intracellulaires activées au cours de ces échanges intercellulaires pourraient être les clés de l'effet bénéfique ou délétère de la réponse microgliale (voir pour revue (Lai and Todd, 2006)). Le détail des ces mécanismes moléculaires n'est pas encore complètement élucidé, mais ils impliquent vraisemblablement les voies de signalisations de Toll-like récepteurs, au centre de cette réponse immune innée à l'interface de processus destructifs et régénératifs, et susceptibles d'être manipulées et reprogrammées par conditionnement (Marsh et al., 2009).

EFFETS délétères	EFFETS bénéfiques
Effet neuroprotecteur des anti-inflammatoires (<i>cyclines</i>)	Effets neuroprotecteur d'injections intraventriculaires ou intra-artérielles de cellules microgliales
Production des cytokines pro-inflammatoires (<i>l'IL-1, l'IL-6 et le TNFα</i>)	Rôle délétère d'une déplétion microgliale
Sécrétion de molécules cytotoxiques (<i>NO, radicaux libres, glutamate..</i>)	Production de facteurs de croissance neurotrophiques (<i>BDNF, IGF-1, Gal-3</i>)
Propriétés neurotoxiques (<i>notamment si activation par le LPS</i>)	Effet neuroprotecteur exercé via la phagocytose de polynucléaires infiltrant
Effet neuroprotecteur de la modulation de la prolifération microgliale	Effet délétère de la suppression de la prolifération d'une sous-population microgliale
	Effet neuroprotecteur in vitro de l'adjonction de cellules microgliales en culture
	Effet bénéfique des facteurs de croissance myéloïdes (MCSF)
EFFETS ambivalents	
Cytokines pro-inflammatoires (<i>l'IL-1, l'IL-6 et le TNFα</i>) \neq forcément délétères Selon le mode d'activation du système des TLRs : effet neurotoxique ou protecteur	

Tableau 2 : Effets de l'activation microgliale au cours de l'ischémie cérébrale : Arguments expérimentaux en faveur d'un effet délétère/protecteur ou ambivalents

III) LES AUTRES CELLULES IMPLIQUEES DANS LA REACTION INFLAMMATOIRE POST-ISCHEMIQUE

III. 1) Les astrocytes

Ce sont des constituants essentiels de l'unité neurovasculaire, concept défini à partir de l'observation de la promiscuité anatomique et fonctionnelle entre cellules endothéliales, pieds astrocytaires et neurones (del Zoppo and Mabuchi, 2003). Pour l'équipe de del Zoppo et al, (del Zoppo, 2009), ces échanges tripartites sous-tendent les adaptations homéostatiques de la microcirculation cérébrale.

En condition inflammatoire, les astrocytes activés, caractérisées par l'expression de la GFAP (Glial Fibrillary acidic protein) (Pekny and Nilsson, 2005) adoptent des fonctions immunitaires, de cellules présentatrices d'antigènes, de phagocytose, et de sécrétion de cytokines (notamment d'Il-1 β et de TNF- α) et de chimiokines (Dong and Benveniste, 2001). En condition physiologique, les astrocytes jouent un rôle actif dans le métabolisme et l'alimentation en glucose des neurones mais aussi dans la recapture des différents neurotransmetteurs, notamment du glutamate. En condition ischémique, le relargage glutamate par les neurones en souffrance, est à l'origine de lésions d'excitotoxicité. Ces lésions ischémiques peuvent être exacerbées par l'inversion du fonctionnement des transporteurs astrocytaires impliqués normalement dans la recapture du glutamate (Kosugi and Kawahara, 2006). Ce relargage de glutamate par les astrocytes soumis à un stress ischémique serait impliqué dans la survie de la cellule astrocytaire (Kosugi and Kawahara, 2006). Il pourrait être également impliqué dans l'activation des cellules microgliales via leurs récepteurs métabotropiques comme cela a été montré dans des modèles de neurotoxicité in vitro (Taylor et al., 2002).

III. 2) Les constituants de la barrière hémato-encéphalique altérée

Les phénomènes inflammatoires post-ischémiques sont étroitement liés à l'état de la barrière hémato-encéphalique, qui régit les échanges entre le système immunitaire périphérique et le tissu cérébral. L'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) protège en effet le microenvironnement neuronal en limitant notamment la pénétration de cellules sanguines et en isolant ainsi le parenchyme cérébral des conditions systémiques.

C'est Medawar (Medawar, 1948) qui le premier a mis en évidence ce concept d'immuno-privilège en montrant que des greffons d'origine cutanée étaient rejetés plus tardivement dans le cerveau que lorsqu'ils étaient implantés dans l'épiderme. Cette particularité est due, entre autres, à la présence de deux barrières limitant les échanges entre sang et SNC : la BHE et les plexus choroïdes (PC). Ces deux barrières restreignent les échanges cellulaires et moléculaires entre sang et SNC, et limitent considérablement la présence de cellules immunitaires (cellules dendritiques et lymphocytes T) dans le tissu cérébral sain (Reese and Karnovsky, 1967)

En condition pathologique inflammatoire, il existe une interdépendance étroite entre l'état de cette BHE et les processus inflammatoires.

La fonction de la BHE repose sur l'intégrité de sa matrice cellulaire constituée par les cellules endothéliales, la lame basale et les prolongements astrocytaires. L'ischémie endommage cette matrice et perturbe les interactions intercellulaires. La fréquence des altérations de la BHE rapportées au cours des accidents vasculaires varie de 15 à 66 % en fonction de la sévérité de l'ischémie, des méthodes d'exploration et de la fenêtre temporelle d'évaluation (Brouns and De Deyn, 2009). Plusieurs mécanismes contribuent à ces altérations, qui se constituent schématiquement en deux phases.

Dès la 2^{ème} heure post-ischémie, la lame basale endothéliale est dissolue (Hamann et al., 1995) ce qui entraîne rapidement une augmentation de la perméabilité de la barrière (Belayev et al., 1996). Cette perte de la BHE conduit à une accumulation de bradykinine (Kamiya et al., 1993) (Aschner et al., 1997), de facteur de croissance endothélial vasculaire (VGEF) (Abumiya et al., 1999), de thrombine et d'enzymes de catabolisme des constituants la matrice extracellulaire, notamment de métalloprotéinases (Gidday et al., 2005; Kelly et al., 2008; Rosell et al., 2008) (Gasche et al., 1999) (Clark et al., 1997). Le stress oxydatif est un stimulus précoce à l'origine de ces lésions endothéliales, qui aboutit en particulier au relargage par les neurones, les cellules gliales et endothéliales, de MMP-9 (Heo et al., 2005). Il s'agit d'une des principales enzymes protéolytiques responsables de la digestion de la lame basale (Gasche et al., 2001; Gidday et al., 2005; Heo et al., 1999; Wagner et al., 2003), qui va permettre l'infiltration des leucocytes sanguins et la constitution d'un œdème vasogénique. Le degré d'expression des métalloprotéases est corrélé, dès les premières heures post-ischémie, à la sévérité de l'atteinte de la BHE (Heo et al., 2005). L'expression de la MMP-9, est ainsi corrélée au degré de perméabilité de la BHE (Fujimura et al., 1999) et donc au risque hémorragique, et celle de la MMP-2 à la sévérité de destruction neuronale (Gasche et

al., 1999; Heo et al., 2005; Lapchak et al., 2000). Expérimentalement, l'inhibition pharmacologique des MMP prévient la destruction de la BHE et réduit le volume lésionnel ischémique (Asahi et al., 2001) (Rosenberg et al., 1998).

Après cette première phase de destruction précoce de la BHE, survient une 2^{ème} série d'altérations survenant entre la 24^{ème} et la 72^{ème} heure post-ischémie (Kastrup et al., 1999). Cette 2^{ème} phase est complexe et fait intervenir notamment la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles ayant infiltré la lésion à la faveur des premières lésions précoces de la BHE (Rosell et al., 2008) (Gidday et al., 2005). Les phénomènes inflammatoires semblent étroitement intriqués avec les altérations de la BHE, au moins dans certains modèles d'inflammation périphérique. Par exemple, certains produits de dégradation de la matrice extracellulaire ont des activités cytokiniques. Ainsi, l'élastase sécrétée dans le milieu extracellulaire par la dégranulation des polynucléaires d'un liquide bronchoalvéolaire inflammatoire clive la laminine-5 extracellulaire en générant un peptide doué de propriété chimiotactique vis-à-vis des polynucléaires (Mydel et al., 2008). De même, la MMP-8 sécrétée elle aussi par dégranulation des polynucléaires dans un modèle de plaie cornéenne, génère lors de la digestion du collagène un peptide également chimioattractif pour les polynucléaires (Lin et al., 2008). L'existence de telles interactions réciproques entre les mécanismes d'altérations de la matrice extracellulaire et d'infiltration des leucocytes inflammatoires reste à être démontrée au cours d'un processus inflammatoire du système nerveux central, comme l'ischémie, en sachant que la lame basale endothéliale cérébrale contient elle-aussi de la laminine-5 et du collagène.

III. 3) Les autres cellules immunitaires sanguines : neutrophiles et lymphocytes,

La participation des cellules sanguines à la réaction inflammatoire post-ischémique est étroitement liée à leur infiltration du parenchyme cérébral lésé à la faveur d'une rupture de la BHE décrite ci-dessus.

III. 3. a) Les polynucléaires neutrophiles

Les neutrophiles ont longtemps été considérés comme les premiers leucocytes infiltrant la lésion ischémique cérébrale (Ritter et al., 2000), suivis par le peloton des macrophages, des lymphocytes T, et des cellules dendritiques (Garcia et al., 1994).

Cet ordre a été récemment remis en cause par une description de la dynamique spatio-temporelle de l'accumulation des cellules immunes analysée par cytométrie de flux, dans un modèle d'ischémie transitoire chez la souris (Gelderblom et al., 2009). Même si dans ce modèle, les polynucléaires neutrophiles infiltrent le parenchyme cérébral lésé plus tardivement que précédemment décrit, ils représentent toujours la majorité des cellules immunes dans l'hémisphère lésé 3 jours après l'ischémie/reperfusion. Cette accumulation massive de neutrophiles a été largement décrite dans des modèles animaux (Barone et al., 1992; Connolly et al., 1996) (Clark et al., 1994; Prestigiacomo et al., 1999), mais également dans les lésions ischémiques cliniques (Kochanek and Hallenbeck, 1992). L'accumulation de neutrophiles dans l'infarctus, étudiée par scintigraphie aux polynucléaires marqués (au ^{99m}Tc HMPAO), apparaît corrélée à la sévérité de la lésion ischémique tissulaire et à l'évolution neurologique péjorative (Akopov et al., 1996). D'autres études expérimentales chez l'animal cette fois, ont également montré une corrélation forte entre l'importance de l'infiltration de polynucléaires et la taille lésionnelle (Beray-Berthat et al., 2003a) (Matsuo et al., 1994; Weston et al., 2007).

Les neutrophiles en conditions post-ischémiques sont une source majeure de radicaux libres et d'enzymes protéolytiques (Segal, 2005). L'inhibition de cette production de radicaux libres par les polynucléaires est effectivement neuroprotectrice (Wang et al 2006 et Tang et al 2007). De même, l'inhibition de la pénétration des leucocytes dans le tissu cérébral ischémié, même si elle ne cible pas spécifiquement les polynucléaires, exerce un effet neuroprotecteur certain, suggérant là aussi un effet délétère de cette infiltration massive de polynucléaires (Connolly et al., 1996) (Yanaka et al., 1996). L'inhibition des fonctions des neutrophiles (adhésion, infiltration, migration, sécrétion de radicaux libres, et dégranulation) par inactivation du gène de la protéine kinase Cdelta réduit notablement les lésions dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez la souris (Chou et al., 2004). Les polynucléaires pourraient également contribuer aux dommages ischémiques par le biais du phénomène de "no-reflow" (del Zoppo, 1991 #183). L'accumulation microvasculaire de neutrophiles aux abords de la lésion contribuerait à l'occlusion et limiterait la reperfusion, aggravant ainsi potentiellement les lésions tissulaires, comme cela a été montré dans l'ischémie myocardique. Ritter et al. (Ritter et al., 2000) ont étudié l'accumulation des leucocytes dans la microcirculation corticale dans un modèle d'occlusion transitoire (tMCAO) chez le rat. Ils ont constaté une augmentation significative de leucocytes dans les veinules post-capillaires au cours de la première heure après la reperfusion et une accumulation significative, mais plus modeste, dans les capillaires et artérioles. L'effet bénéfique de la phagocytose des

neutrophiles par la microglie activée a par ailleurs été récemment mise en évidence comme mécanisme neuroprotecteur (Neumann et al., 2008), suggérant là encore indirectement un rôle délétère des polynucléaires. L'ensemble de ces données est en faveur d'un rôle délétère joué par les neutrophiles infiltrant les lésions ischémiques.

Néanmoins, il est intéressant de noter que ce rôle a priori délétère des neutrophiles n'est pas univoque puisque leur déplétion n'apporte pas de bénéfice évident sur lors d'une agression ischémique sévère dans un modèle expérimental chez la souris (Beray-Berthat et al., 2003b).

De nouvelles données sur la caractérisation fonctionnelles de sous-populations monocytaires circulantes a ouvert de nouvelles perspectives, notamment de filiation potentielle entre une sous-population de monocytes ((CD115⁺ Ly6C+(Gr1+)) phénotypiquement très proches des granulocytes et les macrophages activés de type M1 en condition inflammatoire, essentiellement infectieuse (Auffray et al., 2009b; Robben et al., 2005). On ne dispose actuellement pas de données pour l'ischémie cérébrale sur cette filiation, pourtant bien démontrées par ailleurs (Sasmono et al., 2007), entre polynucléaires neutrophiles et cellules du système de phagocytes mononuclées.

III. 3. b) Les lymphocytes

Les cellules du système des phagocytes mononuclées (macrophages et microglie) qui dominent la réaction inflammatoire post-ischémique ont des propriétés de cellules présentatrices d'antigènes et sont donc potentiellement impliquées dans la re-stimulation des lymphocytes dans la zone ischémisée (Frenkel et al., 2003). Ces derniers infiltrent également le tissu cérébral ischémié comme cela a été montré chez le rongeur et chez l'homme (Jander et al., 1995; Schwab et al., 2001). Cette infiltration est moins importante que celle des polynucléaires et macrophages (Gelderblom et al., 2009). Le rôle délétère de lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺ a récemment été décrit dans un modèle murin (Yilmaz et al., 2006). Dans ce modèle d'ischémie transitoire, ces lymphocytes T ne constituent pas une source majeure d'interféron gamma (IFN γ), cytokine pro-inflammatoire. D'autres cytokines sécrétées par les lymphocytes T recrutés sont impliqués dans les mécanismes délétères, notamment sur la microcirculation cérébrale en conditions inflammatoires post-ischémiques et post-reperfusion. La cytokine CCL5 (RANTES) est par exemple un bon candidat comme médiateur de cette toxicité médiée les cellules T (Terao et al., 2008)

La population lymphocytaire T infiltrant le parenchyme cérébral lésé dans les jours suivant l'ischémie n'est pas exclusivement composée de cellules CD4⁺/CD8⁺. En effet, Gelderblom et al (Gelderblom et al., 2009), par cytométrie de flux, ont rapporté une augmentation des

cellules T CD4-/CD8- dans l'hémisphère ischémié. Certains auteurs ont suggéré que ces cellules T +/- pourraient être des cellules régulatrices impliquées dans les processus de tolérance (Thomson et al., 2006). Le rôle potentiel de ces cellules régulatrices dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale mérite d'être précisé. Les résultats d'études récentes d' "immunisation" sont en faveur d'un effet bénéfique d'une immuno-tolérance médiée par les lymphocytes T-régulateurs sur les conséquences de la réaction inflammatoire post-ischémique (Chen et al., 2003; Frenkel et al., 2005). Dans la même étude menée par Gelderblom et al, une augmentation des cellules NKT a été constatée dans l'hémisphère ischémié. Il s'agit d'une sous-population de cellules T coexprimant la sous-unité $\alpha\beta$ du récepteur Tet des marqueurs moléculaires de cellules NK (Natural killer) (Miyake and Yamamura, 2007). Ces cellules NKT, comme les lymphocytes T CD4-/CD8-, ont potentiellement des propriétés de cellules régulatrices (Miyamoto et al., 2001). Dans la même étude (Gelderblom et al., 2009), une accumulation de cellules dendritiques exprimant les molécules du CMH II sans les co-stimulateurs CD80 a été mise en évidence. Ces DCs pourraient être impliquées dans le recrutement de ces cellules T régulatrices (Mahnke et al., 2007). Cependant, à notre connaissance, de telles fonctions régulatrices n'ont pas été mises en évidence au cours de la réaction immune post-ischémique, même si tous les acteurs d'une telle immunomodulation sont présents, comme représentés sur la **figure 14**.

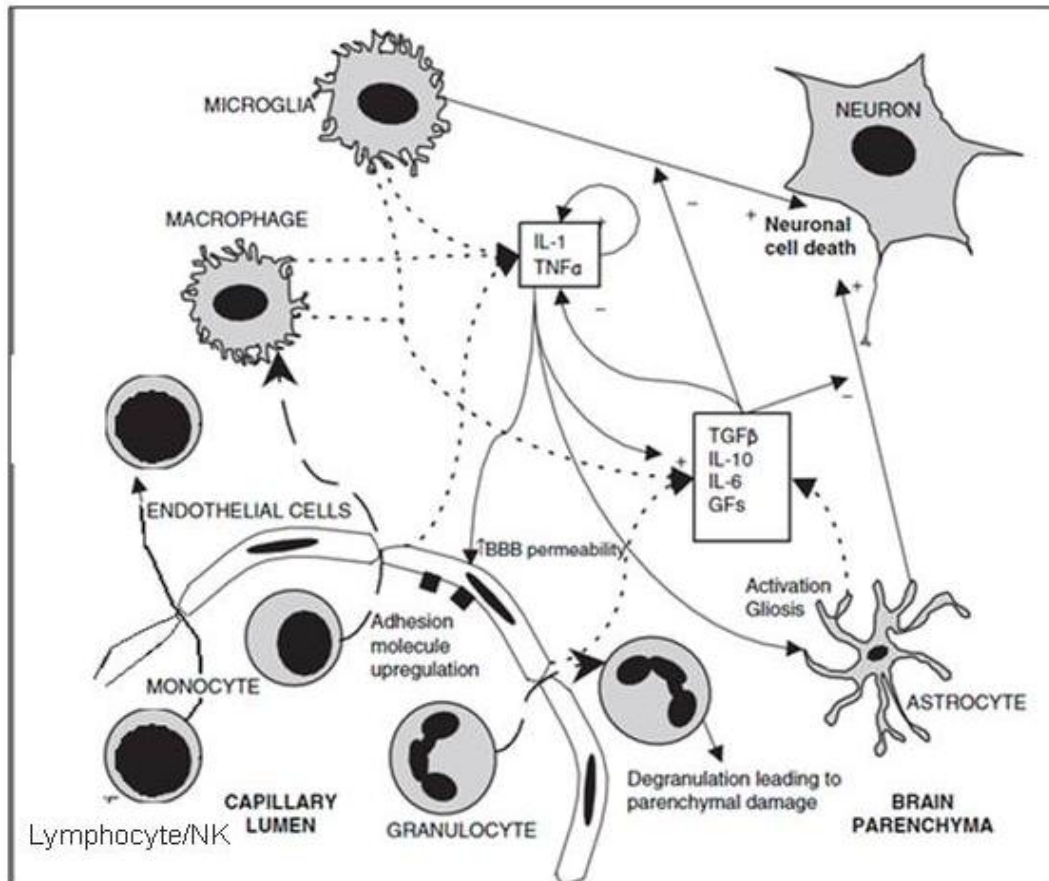


Figure 14: Représentation schématique des acteurs cellulaires et moléculaires de la réaction inflammatoire post-ischémique.

(d'après *The ischemic penumbra. chapter 9 : Parry-Jones et al. 2007*)

3^{EME} PARTIE : IMAGERIE DE LA NEUROINFLAMMATION POST-ISCHEMIQUE

L'étude de l'inflammation cérébrale nécessite en général un examen histologique qui réalise une "photographie" de cette réaction cellulaire et moléculaire à un instant donné. Cette approche histologique n'offre qu'une vision statique ne permettant pas d'aborder la dynamique des processus. Seules des biopsies répétées seraient susceptibles d'offrir une vision dynamique de ces phénomènes caractérisés par un recrutement local de cellules microgliales et de macrophages dérivée du sang. Or ces deux populations phagocytaires sont difficilement distinguables sur des critères morphologiques et fonctionnels (Napoli and Neumann, 2009) (Raivich and Banati, 2004).

Dans ce contexte, l'imagerie cellulaire par résonance magnétique (RM) contribue à la description dynamique du recrutement macrophagique au sein du tissu cérébral ischémié. Cette imagerie cellulaire par RM est basée sur l'utilisation de produits de contraste constitué par des particules d'oxydes de fer dont nous présenterons les propriétés physico-chimiques et magnétiques. Les modalités de leur utilisation (marquage in vivo versus in vitro), ainsi que leurs applications dans les études expérimentales et cliniques de la réaction inflammatoire post-ischémique seront évoquées. Nous verrons également que si l'apport de cette méthodologie IRM à la compréhension de la dynamique de la réaction phagocytaire post-ischémique est incontestable, il persiste des difficultés d'interprétation des signaux IRM justifiant des confrontations entre signaux IRM et distribution histologique du produit de contraste. Le premier objectif de ce travail de thèse s'est inscrit dans ce contexte.

I) PRINCIPES DE L'IRM AVEC NANOPARTICULES DE FER COMME PRODUIT DE CONTRASTE

I. 1) Produits de contraste paramagnétiques:

Définition/composition/synthèse/stabilisation (d'après cours (Wiart, 2009))

Selon la taille des particules de fer superparamagnétiques utilisées en imagerie, on distingue :

- Les nanoparticules de fer superparamagnétiques : **SuperParamagnetic Iron Oxide (SPIO)** de diamètre hydrodynamique supérieur à 50 nm
- Les petites nanoparticules de fer superparamagnétiques : **Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide (USPIO)**, de diamètre hydrodynamique inférieur ou égal à 50 nm.

- Aux extrêmes de cette définition, les microparticules, **Micron-Sized Iron Oxide Particles (MPIO)** dont le diamètre est de l'ordre du micromètre et des nanoparticules de très petite taille, **Very-small Superparamagnetic Iron Oxide particles (VSOP)** d'un diamètre de l'ordre de 7 nm.

Le noyau cristallin de ces agents est constitué d'oxydes de fer, maghémite ou magnétite (Fe_2O_3 , Fe_3O_4) dont le diamètre varie entre 4 et 10 nm (Jung and Jacobs, 1995) (Jung, 1995) (Cheng et al., 2005) (Kellar et al., 1999). La principale méthode pour produire la magnétite (Fe_3O_4) est la technique de coprécipitation de sels ferriques et ferreux (Laurent et al., 2008), qui permet la synthèse en grande quantité de nanoparticules. La stabilisation (électrostatique ou stérique) est une étape cruciale afin d'obtenir un "ferrofluide" colloïdal magnétique, qui ne s'agrége ni dans les milieux biologiques ni les champs magnétiques (Laurent et al., 2008) Enfin, l'enrobage ("coating") est nécessaire à la prévention de la déstabilisation et de l'agglomération de la suspension colloïdale et pour rendre les nanoparticules solubles dans les milieux biologiques ou aqueux. Le noyau magnétique est ainsi incorporé dans une enveloppe de polymère de nature variable (dextran, carboxydextran, feruglose ou amidon). Cette enveloppe influe sur la demi-vie et la bio-distribution du produit de contraste ainsi que sur ses propriétés magnétiques. Elle pourrait également perturber la détection histologique des particules libres (Rausch et al., 2002) (Stroh et al., 2006), qui est classiquement réalisée dans la plupart des études par coloration de Perls (ou bleu de Prusse) mettant en évidence les complexes insolubles contenant l'ion ferrique (Fe^{3+}). La sensibilité de la détection est classiquement augmentée par l'adjonction de diaminobenzidine et d'une solution de sulfate de nickel et d'ammonium à la solution de Perls (Schroeter et al., 2004).

I. 2) Propriétés physico-chimiques et effets paramagnétiques/séquences

Les propriétés des particules d'oxyde de fer dépendent de leur structure physique, à savoir la taille du cristal, sa charge, la nature du coating et la taille hydrodynamique de la particule coatée. Ces caractéristiques physico-chimiques non seulement affectent l'"efficacité" du produit de contraste en IRM, mais aussi sa stabilité, sa biodistribution, son opsonisation et métabolisme, ainsi que sa clairance du compartiment vasculaire (Corot et al., 2006). Les caractéristiques des différentes particules sont illustrées dans le **tableau 2**.

Characteristics of iron oxide nanoparticles currently marketed or under clinical investigations								
Names	Company	Applications	Relaxometric properties * 1.5 T mM ⁻¹ s ⁻¹	T1/2 in human hours** (μmol Fe/kg)	Coating agent	Hydrodynamic size *** (nm)		
Ferumoxides AMI-25 [34] Endorem®/Feridex®	Guerbet Advanced Magnetics	Liver imaging	$r_1 = 10.1$	2	Dextran T10	120–180		
		Cellular labelling	$r_2 = 120$	(30)				
Ferumoxtran-10 AMI-227 [35] BMS-180549 Sinerem®/Combidex®	Guerbet Advanced Magnetics	Metastatic lymph node imaging	$r_1 = 9.9$	24–36	Dextran T10, T1	15–30		
		Macrophage imaging					$r_2 = 65$	(45)
		Blood pool agent						
Ferumoxytol Code 7228 [36]	Advanced Magnetics	Cellular labelling	$r_1 = 15$	10–14	Carboxymethyl-dextran	30		
		Macrophage imaging					$r_2 = 89$	(18–74)
		Blood pool agent						
Ferumoxsil AMI-121 Lumirem®/Gastromark®	Guerbet Advanced Magnetics	Oral GI imaging	n.a.	Oral	Silicon	300		
Ferucarbotran SHU-555A [37] Resovist®	Schering	Liver imaging	$r_1 = 9.7$	2.4–3.6	Carboxydextran	60		
		Cellular labelling	$r_2 = 189$	(8–12)				
SHU-555C [38] Supravist®	Schering	Blood pool agent	$r_1 = 10.7$	6	Carboxydextran	21		
		Cellular labelling	$r_2 = 38$	(40)				
Feruglose NC100150 [39] Clariscan®	GE-HC (abandoned)	Blood pool agent	n.a.	6 (36)	Pegylated starch	20		
Ferristene Abdoscan®	GE-Healthcare	Oral GI imaging	n.a.	Oral	Sulphonated styrene-divinylbenzene copolymer	3500		
VSOP-C184 [40]	Ferropharm	Blood pool agent	$r_1 = 14$	0.6–1.3	Citrate	7		
		Cellular labelling	$r_2 = 33.4$	(15–75)				

* 1.5 T, 37 °C, water or in plasma [33], mM⁻¹ s⁻¹; ** (clinical dose); *** laser light scattering.

Tableau 3: Caractéristiques des principales molécules superparamagnétiques

Corot et al. Advanced Drug Delivery Reviews 2006

Les particules superparamagnétiques ne présentent pas de rémanence magnétique propre mais sont caractérisées par un moment magnétique important lorsqu'elles sont placées dans un champ magnétique extérieur. En effet, au sein d'un champ magnétique, les cristaux s'alignent. Cet alignement crée un important gradient de champ magnétique local qui déphase les spins des protons environnant. Ce déphasage aboutit à la fois à un raccourcissement du temps de relaxation longitudinal T1 et transversal T2. **Figure 15.**

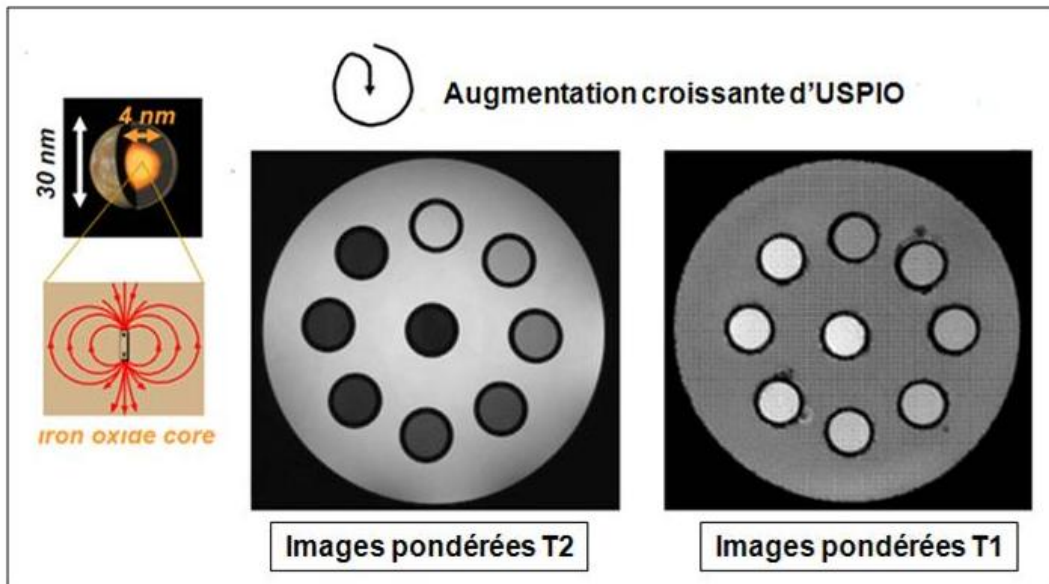


Figure 15: Propriétés magnétiques du Ferumoxtran-10 (Sinerem®)

- En imagerie, on utilise le plus souvent l'effet dit "de **susceptibilité magnétique** " ou "**effet T2***". Celui-ci est lié à d'importantes différences d'aimantation entre deux voxels contigus d'une même image IRM. Cette différence d'aimantation résulte en fait de la distribution hétérogène des nanoparticules qui majore les gradients locaux de champ magnétique. Ces gradients accélèrent le déphasage transversal des spins environnants et entraînent ainsi une importante chute de signal, qui sera largement plus étendue sur l'image IRM que le volume réellement occupé par les particules. La compartimentalisation du produit dans la cellule dans un secteur biologique (intravasculaire par exemple), ou encore l'agrégation des particules augmente de façon importante l'effet T2* (Simon et al., 2006).
- La relaxivité longitudinale de ces nanoparticules est importante, permettant de les utiliser pour diminuer le temps de relaxation longitudinal T1 et induire un hypersignal sur les images pondérées T1 (Muller et al., 1991).
- La relaxivité transversale est élevée, avec une forte diminution du temps de relaxation transversal T2. L'effet T2 est toujours prédominant, mais chaque type de particule va présenter un ratio T1/T2 qui lui sera propre, et qui conditionnera les modifications de signal induites pour un type de séquence donnée (voir **tableau 3**).

L'importance de ces effet T2*, T1 et T2 sont variables suivant le type de séquence utilisée.

I. 3) Propriétés "biologiques" des nanoparticules

Internalisation

Toutes ces nanoparticules d'oxyde de fer ont en commun leur capacité à être internalisées par des cellules macrophagiques. Cette propriété repose sur la capacité naturelle de phagocytose de la population macrophagique. L'internalisation des particules peut être induite par reconnaissance spécifique comme pour des agents pathogènes, ou bien faire l'objet d'une réaction non spécifique. Les interactions qui existent entre USPIO et monocytes/macrophages ne sont pas encore bien connues, mais elles sont d'autant plus complexes qu'elles varient suivant les nanoparticules utilisées. Ainsi, la charge et la nature de l'enveloppe qui entoure le noyau d'oxyde de fer influent directement sur cette captation (Corot et al., 2004). La taille des particules intervient également, avec notamment la participation des récepteurs SR-A (scavenger receptor) (Raynal et al., 2004). Les caractéristiques de l'enrobage qui entoure le noyau magnétique influence également leur captation (Fleige et al., 2002; Metz et al., 2004). Moore et al. ont évalué la captation in vitro de MIONs opsonisés (Moore et al., 1997). Après opsonisation, le mécanisme d'endocytose était médié par le récepteur de la transferrine alors que sans opsonisation, les particules subissaient une endocytose en phase fluide. Le type de cellule est bien sûr à considérer, ainsi que son état d'activation, de même que l' "environnement " cellulaire, notamment le contexte inflammatoire. Von Zur Muhlen et al. (von Zur Muhlen et al., 2007) a par exemple montré par que la phagocytose des SPIO était médiée par l'expression du récepteur aux intégrines Mac1(CD11b/CD18) notoirement connu pour être impliqué dans l'adhésion leucocytaire et l'activation du complément en condition inflammatoire. Les mécanismes d'activation humorale sont également susceptibles de majorer la captation des nanoparticules par des macrophages activés. Ainsi, Rogers et al. rapportent une augmentation in vivo de l'endocytose de SPIO (Feridex®) par adjonction de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et IFN- γ), alors qu'elle est diminuée par l'adjonction d'une statine (Rogers and Basu, 2005).

Bio-distribution

La bio-distribution des nanoparticules est largement influencée par leur taille et leur captation par le système réticulo-endothélial. Les SPIO et MPIO sont rapidement captées au niveau du foie par les cellules de Kupffer, à un moindre degré au niveau de la rate, et en faible quantité au niveau de la moelle osseuse et des aires ganglionnaires. Les USPIO sont retrouvées dans le foie en quantité moins importante, avec des concentrations significatives au niveau de la rate et des aires ganglionnaires (Weissleder et al., 1989).

Demi-vie

Les molécules les moins rapidement captées (car plus petites et/ou recouvertes d'une surface anionique) auront une demi-vie plus longue et seront potentiellement davantage susceptibles de marquer d'autres cellules (monocytes circulants) ou d'être retrouvées dans un territoire " cible " (système ganglionnaire, sites inflammatoires). La demi-vie est également fonction de la dose de produit de contraste. Sa demi-vie est peu modifiée lorsqu'elle reste dans la fenêtre des doses utilisées en imagerie clinique, mais peut augmenter si une charge plus importante sature la captation physiologique. Inversement, le métabolisme, qui diffère en fonction des espèces, influence également la demi-vie du produit. Cette demi-vie des différentes nanoparticules d'oxyde de fer varient ainsi entre 1 heure et 24-36 heures, chez l'homme, où elle est en général plus longue que chez l'animal (Corot et al., 2006). Comme l'accès des particules aux compartiments tissulaires est facilité par une circulation sanguine prolongée, les doses d'USPIO utilisées dans l'expérimentation animale (200 à 1000 $\mu\text{mol Fe/Kg}$) sont bien supérieures aux doses des études cliniques chez l'homme (45 $\mu\text{mol Fe/Kg}$) (Corot et al., 2004).

Dégradation – élimination

Le métabolisme intracellulaire des particules dépend de sa composition chimique. Le ferumoxtran-10 est métabolisé via la voie lysosomale en 7 jours (Schulze et al., 1995). L'enveloppe de polymères de dextran biodégradable est détruite par réaction enzymatique, le noyau d'oxyde de fer est recyclé, progressivement incorporé au pool de fer de l'organisme puis notamment réutilisé pour la synthèse de l'hémoglobine. Ce catabolisme est essentiel dans la mesure où cette source exogène de fer est potentiellement toxique pour les cellules cérébrales (Gaasch et al., 2007).

Si les particules actuellement disponibles ont prouvé leur absence de toxicité à long terme, il est nécessaire d'évaluer le métabolisme du fer et l'environnement bioenzymatique impliqué dans le stockage du fer pour chaque nanoparticule d'oxyde de fer en cours de développement. Il n'est pas possible de prédire le comportement pharmacocinétique, le profil métabolique ou la distribution intracellulaire d'une particule donnée en se référant aux propriétés de particules analogues.

Biocompatibilité et effet des particules sur les cellules immunitaires

L'innocuité systémique de plusieurs particules d'oxyde de fer a été évaluée après injection chez l'homme. Ces essais cliniques ont montré que les produits de contraste satisfaisaient aux normes toxicologiques et pharmacologiques en vigueur (Corot et al., 2006). Comme pour le métabolisme du fer, il paraît impératif pour chaque nouvelle particule développée de réaliser des études toxicologiques et de pharmacotolérance avant même toute " preuve de concept ". Par ailleurs, la question d'un éventuel effet de l'internalisation des particules de fer sur le comportement et l'état d'activation de la cellule phagocytaire, bien que préoccupante, a finalement été assez peu étudiée. Ardab et al. (Arbab et al., 2003b) (Arbab et al., 2004) ont réalisé des tests fonctionnels in vitro qui n'ont pas mis en évidence d'effets majeurs de la phagocytose des particules en terme de production de radicaux libres par les macrophages. Cependant, Siglienti et al. (Siglienti et al., 2006) ont au contraire montré, également in vitro, sur des macrophages murins, que l'internalisation de SPIO/USPIO entraînait un " shift " du profil d'activation macrophagique vers un profil plutôt anti-inflammatoire. La phagocytose des particules était dans cette étude associée à l'augmentation de la production de cytokine anti-inflammatoire IL-10 et à la diminution de celle du TNF α pro-inflammatoire. La pertinence " fonctionnelle ", in vivo des ces altérations phénotypiques n'a pas été étudiée. Néanmoins, il nous semble nécessaire de retenir l'existence de ces possibles interactions entre le produit de contraste et les phénomènes inflammatoires que celui-ci est supposé marquer. Si ces altérations phénotypiques des cellules inflammatoires par la prise en charge du produit de contraste existent effectivement in vivo, il paraît indispensable d'évaluer ces effets et leurs conséquences sur les phénomènes étudiés.

II) APPLICATIONS DES USPIO A L'IMAGERIE CELLULAIRE DE L'INFLAMMATION

Il existe deux modalités pour marquer les cellules inflammatoires ayant potentiellement un tropisme pour le tissu cérébral au cours de la réaction post-ischémique : le marquage in vivo par injection systémique (en général intraveineuse iv) et le marquage ex vivo de cellules secondairement injectées et suivies in vivo. Nous verrons que la première approche, la plus simple car ne nécessitant la plupart du temps qu'une injection intraveineuse, a été privilégiée dans les études expérimentales et cliniques des processus inflammatoires post-ischémiques.

II. 1) Marquage in vivo par injection systémique

La sectorisation des nanoparticules au sein de l'arbre vasculaire est propice à l'évaluation angiographique par IRM. Cependant, cette application des produits de contraste ne sera pas abordée.

II. 1. a) Principes du marquage par injection in vivo et rappel historique des applications en imagerie biomédicale

Principes du marquage in vivo

Si in vitro presque toutes les cellules peuvent être marquées par des particules de fer (Raynal et al., 2004) (Walczak et al., 2005), in vivo, ce sont essentiellement les cellules du système des phagocytes mononucléés qui spontanément prennent en charge les particules injectées dans la circulation sanguine. Or ce sont précisément ces cellules qui dominent la réaction cellulaire inflammatoire post-ischémique (cf 2^{ème} partie). De manière générale, comme décrit au § I) 3), il est théoriquement possible de " jouer " sur la demi-vie du produit de contraste pour cibler un compartiment phagocytaire. Schématiquement, une demi-vie courte privilégie la capture par le système réticulo-endothélial lors du premier passage hépatique et une demi-vie longue privilégie les macrophages tissulaires et les monocytes circulants du compartiment sanguin (cf 2^{ème} partie).

Bref rappel des applications biomédicales

Historiquement, les premières études d'imagerie cellulaire avec des particules d'oxyde de fer se sont intéressées aux macrophages du parenchyme hépatique (les cellules de Kupffer), appartenant au système réticulo-endothélial, site privilégié de la captation et de l'élimination des particules ferromagnétiques (Stark et al., 1988) (Weissleder, 1994). L'imagerie hépatique utilise essentiellement des SPIO qui sont, du fait de leur taille plus importante, plus rapidement captés par les cellules de Kupffer. Cette captation très rapide entraîne une baisse massive de signal du parenchyme hépatique sain, améliorant ainsi la détection des zones de tissu métastatique ou de tumeurs hépatocytaires qui ne présentent pas de baisse du signal (Semelka and Helmberger, 2001). Le concept du marquage ganglionnaire découle de la même idée avec une baisse de signal des ganglions normaux captant les particules de fer, contrastant

avec celui des ganglions envahis par les cellules tumorales (Bellin et al., 1998). La moelle osseuse est également un site de fixation des nanoparticules (Seneterre et al., 1991).

Puis, dans les années 2000 sont apparues les applications à l'imagerie de la réaction inflammatoire, avec l'utilisation préférentielle d'USPIO, qui, du fait de leur plus petite taille, sont moins phagocytés lors de leur premier passage hépatique et splénique, et sont donc davantage susceptibles de marquer les autres types phagocytaires. La méthodologie USPIO a ainsi été appliquée à l'étude de la réaction inflammatoire affectant le système nerveux périphérique et central (voir pour revue (Stoll and Bendszus, 2009)). Ce sont surtout les modèles de maladies inflammatoires du SNC (comme l'encéphalite auto-immune expérimentale, modèle de sclérose en plaque) qui ont initialement été le champ d'application de l'imagerie cellulaire par IRM avec USPIO (Dousset et al., 1999b) (Dousset et al., 1999a) (Rausch et al., 2003). Ce champ s'est ensuite étendu aux lésions à composante inflammatoire, comme les tumeurs cérébrales (Kircher et al., 2003) (Fleige et al., 2001) (Varallyay et al., 2002) (Neuwelt et al., 2004) et l'ischémie cérébrale (Jander et al., 2007).

II. 1. b) Application à l'imagerie de la neuroinflammation post-ischémique

Au cours de la réaction d'un processus inflammatoire au sein du SNC, les phagocytes captant in vivo les USPIO peuvent avoir théoriquement une double origine (cf 2^{ème} partie):

- Les monocytes circulants, population hétérogène de cellules au potentiel phagocytaire, en contact prolongé avec les USPIO injectés dans le secteur vasculaire et qui devraient donc capter la plupart des particules avant d'infiltrer le tissu ischémié
- Les macrophages résidents du SNC : la microglie et les macrophages périvasculaires et méningés.

Ces deux types cellulaires appartenant au lignage macrophagique et participant à la physiopathologie de l'ischémie cérébrale sont donc susceptibles d'être marqués in vivo par les USPIO. Histologiquement, nous avons vu qu'il n'était pas possible de distinguer formellement certains macrophages dérivant des monocytes du sang adoptant une morphologie ramifiée microglial-like et la microglie activée résidente. L'imagerie par IRM avec injection d'USPIO est supposée résoudre ce problème dans la mesure où, en l'absence de rupture de la BHE, seuls les monocytes circulants marqués ont théoriquement accès au pool de produit de contraste injecté en intraveineux. Cette hypothèse méthodologique est à nuancer à la lumière des résultats obtenus par notre équipe, qui s'est intéressée aux modalités de

passage des USPIO au sein de la lésion ischémique dans un modèle d'AVC chez la souris et dans les études cliniques.

Le **tableau 4** récapitule les études expérimentales et cliniques ayant utilisé des USPIO pour étudier la réaction inflammatoire post-ischémique en IRM.

Etudes Cliniques	Etudes Expérimentales
<ul style="list-style-type: none"> ❑ Time-window: 6-9 days <ul style="list-style-type: none"> • Saleh et al, <i>Brain</i> 2004 • Nighoghossian et al, <i>Stroke</i> 2007 ❑ Time-window: 2-4 days <ul style="list-style-type: none"> • Saleh et al, <i>Stroke</i> 2007 • Cho et al, <i>Cerebrovasc Dis</i> 2008 	<ul style="list-style-type: none"> ❑ Rat <ul style="list-style-type: none"> • Rausch et al, <i>Magn Reson Medicine</i> 2001 • Rausch et al. <i>NMR Biomed</i> 2002 • Kleinschnitz et al, <i>J Cereb Blood Flow Metab</i> 2003 • Saleh et al, <i>NMR Biomed</i> 2004 • Schroeter et al, <i>Magn Reson Medicine</i> 2004 • Kleinschnitz et al, <i>J Cereb Blood Flow Metab</i> 2005 • Engbering et al, <i>J Cereb Blood Flow Metab</i> 2008 • Kim et al. <i>Acta Radiol</i> 2008 • Henning et al. <i>J Cereb Blood Flow Metab</i> 2009 ❑ Mouse (permanent middle cerebral artery occlusion) <ul style="list-style-type: none"> • Wiart et al, <i>Stroke</i> 2007 • Desestret et al, <i>Stroke</i> 2009 • Denes et al., <i>J Cereb Blood Flow Metab</i> 2007

Tableau 4: Etudes expérimentales et cliniques ayant utilisé des USPIO pour étudier la réaction inflammatoire post-ischémique en IRM

II. 1. b. α) Etudes expérimentales

Après une étude pilote ayant montré que l'injection d'USPIO ne modifiait pas l'évolution de lésion ischémique expérimentale (Doerfler et al., 2000), la première étude rapportée d'injection d'USPIO visant à évaluer l'inflammation dans un modèle d'ischémie cérébrale a été réalisée chez le rat en 2001 par Rausch et al. (Rausch et al., 2001). Il s'agissait d'une étude séquentielle après injection intraveineuse de Ferumoxtran-10 (Sinerem®, Guerbet) 5 heures après occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne. Sur les séquences pondérées en T2, leurs auteurs ont montré une chute périlésionnelle de signal le premier jour, puis des hyposignaux dans la lésion jusqu'au 4^{ème} jour. Ces hyposignaux IRM ont été corrélés à la présence sur les coupes histologiques de macrophages (marqués avec un anticorps anti-ED1) contenant des particules de fer (détectées par une coloration au bleu de Perls). La même équipe a utilisé un an plus tard la même méthodologie dans un modèle d'ischémie transitoire (tMCAO), sensé limiter les risques d'altération de la BHE (Rausch et al., 2002). Le timing de

l'injection et la séquence de réalisation des IRM (jours 1, 2, 3 4 et 7) étaient inchangés. L'analyse histologique comprenait des coupes traitées au bleu de Perls pour la détection du fer, un immunomarquage anti-ED1, supposé (à tort) marqué exclusivement les macrophages dérivés du sang et un immunomarquage anti-Griffonia-lectin pour les cellules microgliales résidentes. Seules des modifications de signal en T1 ont été retenues au niveau des vaisseaux à 24 heures, puis dans le noyau caudé à 48 heures. Ces signaux "vasculaires " disparaissaient ensuite progressivement à partir de 72h. Aucun changement de signal après injection d'USPIO n'a été rapporté sur les séquences T2. Au niveau histologique, l'activation microgliale supposée marquée par la Griffonia-lectin n'était objectivée qu'à 96 heures, alors que les macrophages ED-1+ apparaissaient dès 24 heures, plaidant en faveur d'un passage au sein du tissu ischémié des particules internalisées dans les macrophages dérivés du sang.

Ces premiers résultats ont été confirmés dans un autre modèle d'ischémie induit par photothrombose par l'équipe de Kleinschnitz et al. qui ont mené deux études avec des SPIO. Dans la première (Kleinschnitz et al., 2003), plusieurs groupes de (n=3 à 6) rats ont été imagés à des délais différents (à J1, J2, J3, jusqu'à J14) après photothrombose. L'injection des SPIO (0,2 mmol Fe/Kg de Esovist®, Shering) était réalisée 24 heures avant l'IRM. Après l'IRM, les rats étaient sacrifiés pour analyse immunohistochimique (bleu de Perls et immunomarquage anti-ED1). Les animaux imagés à J5 et J6 post-photothrombose présentaient un hyposignal périlésionnel et ceux imagés à J7 et J8 jours un hyposignal modéré au centre de la lésion avec un hypersignal en périphérie sur des séquences pondérées en T2. Les signaux IRM étaient corrélés à un marquage positif du fer au bleu de Perls entre J5 et 8 jours en périphérie puis au centre de la lésion. La présence de macrophages marqués par l'anti-ED1 a été mise en évidence entre J5 et J14, sans fer intracellulaire. Une deuxième étude (Kleinschnitz et al., 2005) a été menée par la même équipe dans le même modèle mais avec des injections de doses plus importantes (0,8 mmol Fe/Kg de Resovist®,) réalisées dès l'induction de la photothrombose. Les IRM étaient réalisées à 3 heures, J1, J2, J5, J7 et J14. Il existait d'emblée un fort hyposignal T2 dans la lésion. Ces signaux ont été interprétés comme liés avec un " piégeage " des particules dans des thrombus vasculaires. Un sous-groupe de rats a été injecté respectivement à 2 heures et 24 heures post-photothrombose avant d'être imagés. Chez les animaux injectés à 2 heures post-photothrombose, une couronne périlésionnelle en hyposignal a été interprétée par les auteurs comme secondaire à la formation des thrombus piégeant les particules au cours de la photothrombose. En effet, chez les rats injectés à 24h après la photothrombose, cet hyposignal n'était pas retrouvé.

Toujours dans le même modèle de photothrombose, une 3^{ème} équipe, celle de Saleh et al. a injecté 300 µmol/Kg de Ferumoxtran-10 (Sinerem®, Guerbet) à des rats cette fois-ci à J5 post-photothrombose (Saleh et al., 2004b). Une IRM à 7 T réalisée 24 heures post-injection a montré une chute de signal en couronne périlésionnelle, colocalisant avec la présence de macrophages ED-1+ et marqués au bleu de Perls sensibilisé à la diaminobenzidine (Schroeter et al., 2004) sur les coupes histologiques correspondantes. Ces résultats obtenus dans ce modèle particulier confirmaient ceux obtenus selon le même protocole d'injection/IRM à +24h par Rausch et al. dans des modèles de tMCAO pMCAO (Rausch et al., 2002) (Rausch et al., 2001), et reproduits récemment par Kim et al. (Kim et al., 2008).

Notre équipe a été la première à réaliser chez la souris une étude prospective durant les 72 premières heures post-ischémie dans un modèle d'occlusion permanente de l'artère sylvienne par électrocagulation (pMCAO) (Wiart et al., 2007). Les nanoparticules de fer superparamagnétiques USPIO utilisées pour cette étude étaient le Ferumoxtran-10, (Sinerem® Guerbet, France). Nous détaillerons particulièrement les résultats de cette étude pilote qui a initié ce travail de thèse.

L'injection du produit était réalisée par voie intra-veineuse de 2 mmol Fe /kg 5 heures après la procédure d'occlusion artérielle. Les souris ont été ensuite imagées avec un protocole IRM comprenant des séquences de diffusion, des séquences pondérée en T2 et T1 en écho de gradient, ainsi qu'une cartographie T2, avant l'injection puis soit juste après l'injection, soit à 12h, 24h, 48h et 72h (**Figure 16**). Après l'IRM, les cerveaux des souris ont été prélevés pour examen histologique. Un immunomarquage anti-F4/80 a été réalisé pour la détection des macrophages/microglie et une coloration de Perls pour celle du fer des USPIO. L'injection des USPIO 5h après pMCAO entraînait une chute de signal marquée en écho de gradient (EG, effet T2*), mais aussi en T2. Cet hyposignal lié à l'injection d'USPIO était essentiellement présent dans le réseau vasculaire pial, mais également en périphérie des lésions (**figure 16B**). Nous verrons que l'interprétation de ces signaux USPIO précoces liés à l'entrée des USPIO dans le cerveau ischémié a fait l'objet de la première étude de ce travail de thèse. A partir de 24 heures, cet hyposignal périlésionnel s'étendait au cœur de la lésion et aux structures adjacentes du cortex et du striatum au sein de l'hémisphère lésé (**figure 16C**). De façon beaucoup plus inattendue apparaissait dans les 24 premières heures, une bande d'hyposignal en pondération T2 qui surlignait le corps calleux ipsilatéral puis s'étendait progressivement au corps calleux de l'hémisphère controlatéral (Figure 25 D-G). En écho de gradient, l'évolution de ce signal calleux était différente : le corps calleux ipsilatéral à la lésion apparaissait sur

l'imagerie réalisée à 24 heures en franc hypersignal, qui s'étendait ensuite vers la région controlatérale. A 36h, l'ensemble du corps calleux était atteint, avec une transition progressive de l'hypersignal vers un hyposignal dont la localisation correspondait à l'hyposignal observé en pondération T2 (**Figure 16D-F**). Cette cinétique intrigante de rehaussement du corps calleux est une des questions soulevées par cette première étude initiant ce travail de thèse.

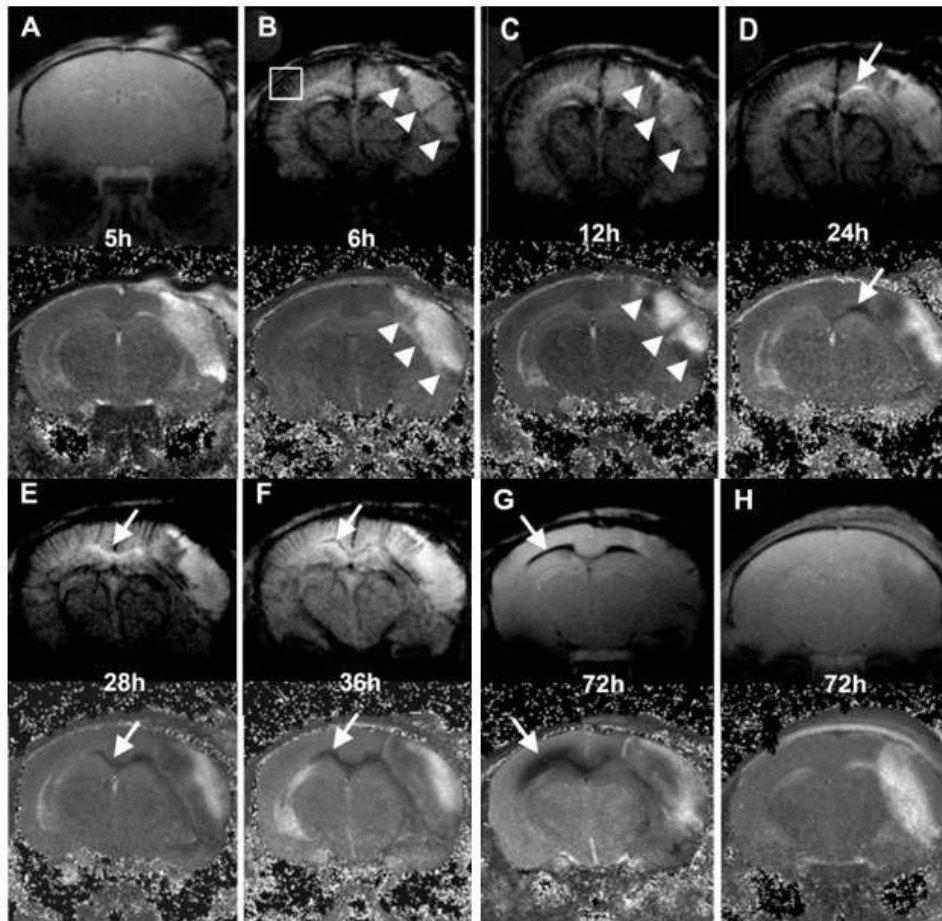


Figure 16: Images d'une souris ischémisée par pMCAO et injectée avec des USPIO, entre 5 et 72 heures, en écho de gradient (ligne supérieure) et en T2 (ligne inférieure).

Présence d'un hyposignal lié à la présence de nanoparticules dans le réseau vasculaire sur le contrôle post-injection (cadre). Apparition rapide et progressive d'un hyposignal péri-lésionnel en rapport avec la présence d'USPIO (têtes de flèches).

Noter la présence d'un signal du corps calleux transitoirement hyperintense à 24 heures puis hypointense en écho de gradient correspondant à un asignal en pondération T2 (flèches).

(H) souris contrôle ayant subi une pMCAO, mais n'ayant pas reçu d'USPIO : Absence d'hyposignal en péri-lésionnel ou au niveau du corps calleux. *Wiert et al. 2007*

Histologiquement, le pattern spatio-temporel de distribution des cellules phagocytaires F4/80+ était parfaitement corrélé à celui des signaux IRM (**Figure 17**).

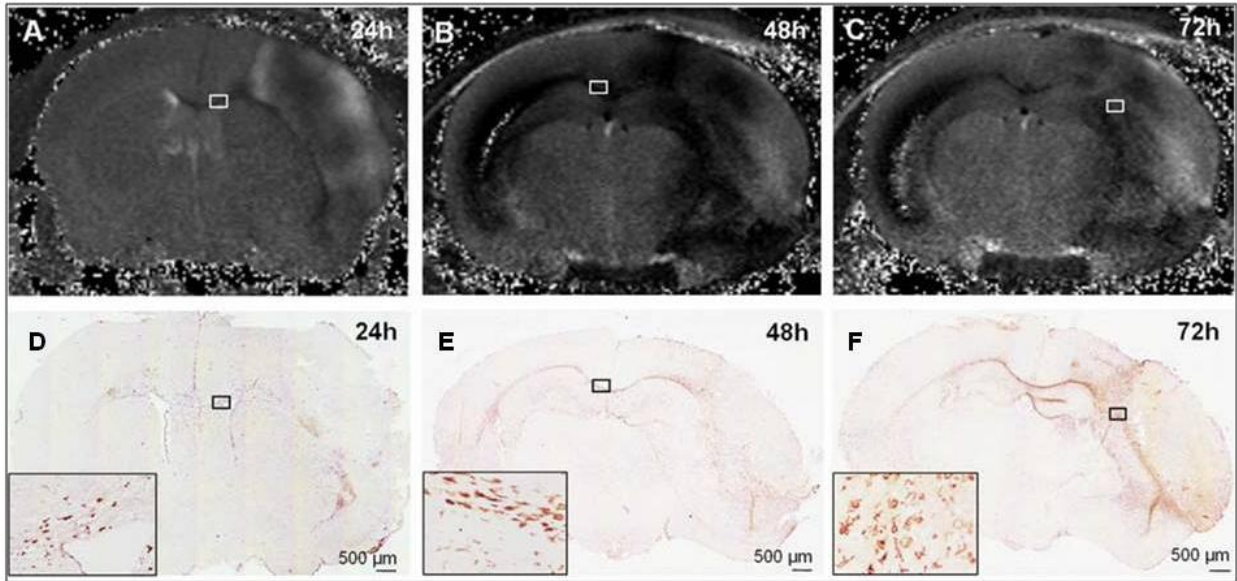


Figure 17: Corrélation entre 24 et 72 heures entre l'évolution de l'hyposignal périlésionnel et du corps calleux (A-C) et les zones de marquage histologique par F4/80 des cellules histiocytaires activées (E-F) (*Wart et al 2007*)

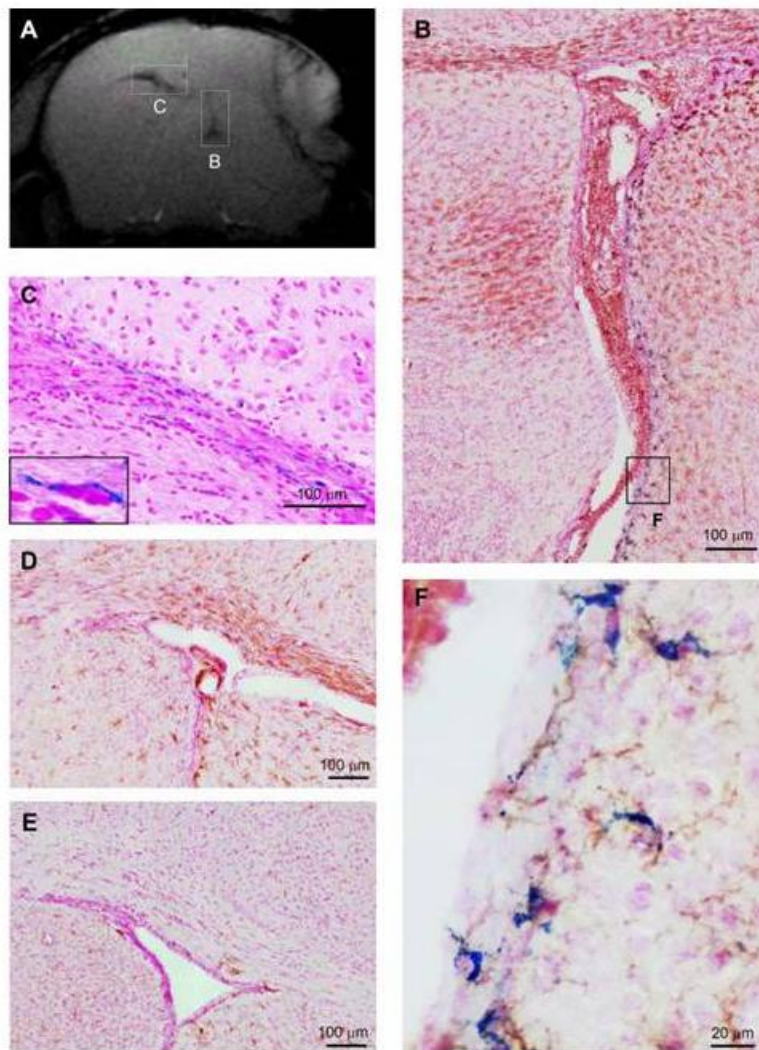


Figure 18:

(A) IRM (séquence en écho de gradient) réalisée 72 heures après injection d'USPIO. Hyposignaux péri-lésionnel, périvericulaire et au niveau du corps calleux controlatéral à la lésion.

(B) Coupe histologique en double marquage par bleu de Perls et immunomarquage anti-F4/80, révélant des cellules macrophagiques contenant du fer dans la région péri-ventriculaire, correspondant à la localisation de l'hyposignal visible en IRM (A).

(C) Coloration au bleu de Perls de la région controlatérale du corps calleux montrant la présence de fer intracellulaire.

(D-E) Immunomarquage anti-F4/80 de la région controlatérale du corps calleux d'une souris ischemiée mais non injectée avec des USPIO (D) et d'une souris contrôle (non ischemiée et non injectée) (E). Visualisation de cellules macrophagiques activées F4 80+ chez la souris ischemiée.

(F) Double marquage F4/80 et Perls de la zone périvericulaire correspondant à un agrandissement de la zone (B). Présence de cellules F4/80+ et Perls+

La coloration de Perl a permis de mettre en évidence à partir de 48h la présence de fer au niveau du corps calleux, des espaces sous-arachnoïdiens de l'hémisphère homolatéral, des plexus choroïdes et des zones péri ventriculaires (**Figure 18C**). La corrélation entre la localisation de l'hyposignal en IRM, la localisation des cellules macrophagiques activées marquées au F4/80 et du marquage au bleu de Perls apportait de forts arguments en faveur d'une phagocytose des nanoparticules, confirmée par la réalisation de doubles marquages anti-F4/80/Perls révélant des cellules macrophagiques microgliales ou microgliale-like marquées par des USPIO, localisées dans le corps calleux et la zone periventriculaire ipsilatérale (Figure 23 B et F). L'originalité de ces résultats réside dans la mise en évidence d'une réaction macrophagique à distance de la lésion dans l'hémisphère non lésé. Cette inflammation à distance est révélée par l'hyposignal du corps calleux controlatéral (**Figure 18A**) et confirmée par l'examen histologique (**Figure 18C**). Ces données constituent une preuve de concept de l'utilité de l'IRM avec USPIO dans l'étude in vivo de l'inflammation

cérébrale " globale ", réactionnelle à la lésion ischémique focale. Cette composante à distance de la réaction inflammatoire post-ischémique n'avait été mise en évidence jusqu'à présent que par des examens histologiques ou grâce à des examens invasifs (Schroeter et al., 1999) (Rupalla et al., 1998), ou plus récemment grâce à la tomographie par émission de positrons TEP (Gerhard et al., 2005).

Concernant la réponse " locale ", ces résultats étaient concordants avec ceux observés précédemment dans divers modèles ischémiques chez le rat (Kleinschnitz et al., 2005) (Rausch et al., 2002) (Schroeter et al., 2004) (Saleh et al., 2004b) (Kim et al., 2008). Les hyposignaux IRM et la présence des cellules macrophagiques étaient cohérents. Il existait néanmoins des discordances topographiques puisque histologiquement des cellules macrophagiques marquées par les USPIO n'étaient pas visualisées par les doubles marquages dans toutes les régions où étaient observés des changements de signaux après injection du produit de contraste supposé cellulaire. Notamment, on ne retrouvait pas dans la zone périlésionnelle, précocement en hyposignal, des macrophages Perls+.

Ces discordances ont motivé des investigations supplémentaires durant les 24 premières post-ischémie, permettant ainsi de préciser la distribution précoce du produit de contraste supposé cellulaire (cf 1^{er} objectif) (Desestret et al., 2009)

Denes et al. (Denes et al., 2007) ont également travaillé sur un modèle transitoire de 30 ou 60 minutes chez la souris en réalisant une injection couplée de 160 $\mu\text{mol/Kg}$ d'USPIO (Ferumoxtran-10) et de 0,1 mmol/Kg de gadolinium au moment de la reperfusion. Cette co-injection était répétée à J1, J2 et J3. Les auteurs n'ont pas retenu de rupture précoce de la barrière car il n'existait pas de réhaussement après gadolinium sur l'IRM initiale. Aucune modification de signal en rapport avec l'injection d'USPIO n'a été également constatée. Histologiquement, seules quelques rares cellules contenant du fer malgré la sensibilisation du bleu de Perls à la diaminobenzidine ont été visualisées. La constatation majeure de l'étude était une prolifération microgliale majeure. Concernant l'imagerie, les résultats de cette étude sont peut-être explicables par la faible dose d'USPIO utilisée ici chez la souris.

De manière générale, ces études de marquage phagocytaire par des nanoparticules injectées en intraveineux au cours d'ischémies expérimentales sont très hétérogènes, contrairement à celles qui ont été menées dans d'autres pathologies (comme l'EAE). Cette hétérogénéité qui concerne les modèles, le timing d'injection et de réalisation des IRM et les séquences utilisées, explique probablement en partie des difficultés d'interprétation, source de

controverses. Ces discussions concernent surtout le mode d'entrée du produit de contraste, supposé cellulaire, dans le parenchyme cérébral lésé. L'hypothèse principale avancée par ces études IRM couplée à l'injection de nanoparticules est une captation périphérique des particules par des phagocytes sanguins infiltrant dans un 2^{ème} temps la zone périlésionnelle et la lésion.

La faisabilité d'une telle approche au cours de l'AVC clinique ainsi que sa pertinence pour l'étude de la dynamique de la réaction inflammatoire post-ischémique ont été évaluées.

II. 1. b. β) Etudes cliniques

A ce jour, l'IRM avec injection d'USPIO chez des patients présentant un AVC est limitée à 4 études. Les contraintes cliniques de prise en charge des patients, privilégiant bien sûr la thérapeutique, ont pour conséquence un "décalage" de la fenêtre temporelle des explorations cliniques par rapport à celle des études expérimentales. Ainsi, les 2 premières ont été réalisées entre le 6^{ème} et le 9^{ème} jour post-AVC alors que les 2 études " précoces " se sont intéressées à la période s'étendant du 2^{ème} au 4^{ème} jour.

Saleh et al. (Saleh et al., 2004a) ont réalisé un essai de phase II chez 10 patients. Les USPIO (Sinerem®) ont été injectés à la dose de 2,6 mg Fe/Kg du 5^{ème} au 6^{ème} jour après le début des symptômes. Comme dans les essais précliniques, ces injections ont été bien tolérées. En complément des IRM multimodales standard, réalisées dans les 24 premières heures de la prise en charge en unité neurovasculaire, 2 IRM supplémentaires ont été réalisées 24h et 48 heures après l'injection d'USPIO, c'est-à-dire entre le 6^{ème} et 8^{ème} jour post-AVC. Chez les 10 patients ont été visualisées des modifications de signal après injection d'USPIO. Il existait 2 profils d'altérations du signal imputées à l'injection d'USPIO : un réhaussement T1, essentiellement en périphérie des lésions, ayant tendance à s'étendre entre la 1^{ère} et la 2^{ème} IRM et des hyposignaux T2, associés au vaisseaux, régressant progressivement, parallèlement à la clairance vasculaire du produit de contraste. Le 1^{er} réhaussement, en hypersignal T1, a été interprété comme secondaire à une infiltration de phagocytes circulant marqués par le produit de contraste injecté dans la circulation le 5^{ème} jour après l'ischémie.

Nighoghossian et al. (Nighoghossian et al., 2007) ont également évalué 10 patients ayant présenté un AVC en réalisant une IRM à la prise en charge, puis une IRM au 6^{ème} jour suivie

d'une injection de 2,6 mg Fe/Kg de Sinerem® et une nouvelle IRM au 9^{ème} jour post-ischémie. A J9, des anomalies après injection d'USPIO étaient présentes chez 9 patients sur 10 en T1 et 5 sur 10 en T2*. Ces altérations du signal étaient hétérogènes et ne paraissaient pas liées à une éventuelle rupture de la BHE, mise en évidence par un réhaussement après injection d'un chélate de gadolinium.

Saleh et al. (Saleh et al., 2007) ont étendu la fenêtre d'étude à des stades plus précoces post-ischémie en réalisant un protocole d'IRM itératives après une injection d'USPIO entre la 24^{ème} et la 36^{ème} heure post-ischémie chez 12 patients. Neuf patients ont bénéficiés du protocole complet qui comprenait au total 4 IRM : une entre 24 et 36h post-injection, une 2^{ème} entre 48 et 72h post-injection, une 3^{ème} entre J7 et J8 post-injection et enfin une 4^{ème} entre J10 et J11 post-injection. Seuls 3 patients sur 9 analysés présentaient un hypersignal sur les séquences T1. Aucune lésion n'était réhaussée après injection de gadolinium.

Cho et al. (Cho et al., 2007b) ont réalisé une étude comparable chez 5 patients avec une injection de Sinerem® à J2 après le début de l'AVC et une IRM post-USPIO à J4. Seul 1 patient présentait un réhaussement lésionnel en T1 après injection d'USPIO.

A ces stades précoces, l'hétérogénéité de ces prises de contraste imputées à l'injection du produit de contraste supposé intramacrophagique a été interprétée par nos collègues allemands et nous-mêmes, comme reflétant une hétérogénéité interindividuelle de la réaction inflammatoire précoce post-ischémique (Saleh et al., 2007), sans relation avec le volume lésionnel, contrairement aux données classiques d'analyse de la réponse inflammatoire par des méthodes de médecine nucléaire (Akopov et al., 1996). Cette interprétation exclue d'autres facteurs, potentiellement confondants, de variabilité interindividuelle de ces prises de contraste. Pour valider l'utilisation des USPIOs comme biomarqueurs cellulaires spécifiques de l'inflammation post-ischémique, il paraît indispensable d'étendre de telles études cliniques à un plus grand nombre de patients et de compléter expérimentalement la recherche systématique de processus non-spécifiques qui pourraient expliquer cette hétérogénéité des images. Ces études expérimentales reposent sur des confrontations des signaux IRM après injection d'USPIO avec la distribution histologique du produit de contraste à des stades précoces post-ischémie. C'est l'objectif de la première étude de ce travail de thèse.

II. 1. a. γ) Apports des études et questions ouvertes

Démonstration par l'imagerie cellulaire d'une infiltration macrophagique tardive

Les études expérimentales (Kleinschnitz et al., 2003; Rausch et al., 2002) (Denes et al., 2007; Kim et al., 2008; Saleh et al., 2004b) et cliniques (Saleh et al., 2004a) (Nighoghossian et al., 2007) utilisant l'IRM avec nanoparticules de fer ont apporté des arguments supplémentaires en faveur d'une infiltration différée de cellules macrophagiques dérivées du sang, mise en évidence expérimentalement grâce à l'utilisation de souris transgénique (Schilling et al., 2003) (Schilling et al) ou par déplétion périphérique de macrophages (Schroeter et al., 1997) (cf § 2^{ème} partie). La démonstration par cette méthodologie non invasive d'une infiltration tardive du tissu ischémié par des phagocytes ayant pris en charge les particules de fer en périphérie, n'est valable qu'en l'absence de diffusion passive des USPIO à la faveur d'une rupture de la BHE. En effet, si les particules pénètrent de façon libre dans le parenchyme cérébral lésé, l'origine périphérique des cellules les phagocytant ne peut plus être affirmée.

La question controversée du passage non-spécifique des USPIO via une rupture de la BHE

Dans ces études, les auteurs ont donc systématiquement pris le soin d'écarter une telle altération de la BHE dans leurs modèles ou chez les patients, ou bien de dissocier le marquage USPIO des altérations de la BHE quand celles-ci existaient indéniablement dans le modèle utilisé. Ainsi, Rausch et al (Rausch et al., 2002) et Denes et al. (Denes et al., 2007) ont signalé qu'ils ne retrouvaient pas d'arguments en faveur d'une altération de la BHE dans leur modèle de tMCAO. Quand à Saleh et al. (Saleh et al., 2004b), ils concluaient à l'absence de rapport entre signaux USPIO et rupture de la BHE, car cette dernière, appréciée par un réhaussement de la lésion de photothrombose après injection de gadolinium, était présente dès les premières heures post-photothrombose et persistait jusqu'au 14^{ème} jour. En raison de ce découplage temporel entre les altérations de la BHE et les signaux IRM mis en évidence entre le 8^{ème} et 10^{ème} jour et imputés à l'infiltration de phagocytes hématogènes, ces auteurs excluaient une influence de la rupture de la barrière sur l'entrée des USPIO dans le tissu cérébral. Dans les essais cliniques, le même raisonnement a été appliqué. Les changements de signaux après injection d'USPIO n'étant pas systématiquement associées (3 lésions réhaussées par le gadolinium sur 10 dans l'étude de Saleh et al. (Saleh et al., 2004a)), ni spatialement superposables (Nighoghossian et al., 2007) (Cho et al., 2007b) aux éventuels

réhaussements après injection de gadolinium, la rupture de la BHE ne serait pas impliquée dans les signaux USPIO+. Il s'agit en fait d'arguments indirects en défaveur d'un lien entre marquage USPIO et altération de la BHE. En l'absence d'une étude dynamique et approfondie de l'état de la BHE post-ischémique, il nous paraît difficile, voire abusif, d'écarter la possibilité d'une diffusion, même transitoire du produit de contraste vasculaire. Cette évaluation " fonctionnelle " de la BHE nécessiterait des moyens d'exploration autres que le classique " réhaussement après injection de gadolinium ". En effet, une absence de réhaussement après injection de gadolinium réalisée à un moment donné en post-ischémie, ne permet pas d'exclure une altération transitoire et fugace de la BHE. Au cours de notre étude chez la souris (Wiart et al., 2007), la constatation de signaux précoces après injection d'USPIO nous a conduits à rechercher une telle diffusion passive des USPIO à la faveur d'une rupture précoce de la BHE dans notre modèle (cf 1^{er} objectif). D'autres auteurs utilisant aussi des injections iv d'USPIO dans un modèle de photothrombose (Engberink et al., 2008) ont également noté la présence de signaux imputés à l'injection d'USPIO dès les premières heures suivant l'induction de l'ischémie et l'injection des particules. Ces observations n'étaient pas explicables par une infiltration de cellule marquées. Ces observations ont fait suggérer la possibilité de phénomènes non spécifiques rendant l'interprétation des modifications de signal IRM après injection d'USPIO délicate, à la fois dans les études expérimentales mais a fortiori dans les études cliniques. Nous aborderons ultérieurement les hypothèses évoquées pour expliquer le passage précoce des particules dans le tissu cérébral ischémié dans notre modèle d'ischémie permanente chez la souris (1^{er} objectif).

Autres sources potentielles d'hyposignaux IRM non spécifiques

D'autres sources de signaux USPIO non spécifiques ont été évoquées. Weber et al. (Weber et al., 2005) ont détectés des hypointensités sur les séquences T2* à des stades tardifs post-ischémie (10^{ème} semaine) correspondant histologiquement à la présence de macrophages contenant du fer. Ces cellules marquées (Perls +) ont été retrouvées au sein de la cicatrice d'infarctus et ont été interprétées comme des sidérophages ayant phagocyté localement des érythrocytes issus des vaisseaux lésés par l'ischémie (Weber et al., 2005). Ces constatations soulèvent le problème du marquage non spécifique par le fer endogène érythrocytaire secondaire à des remaniements hémorragiques. Ces signaux non spécifiques sont facilement identifiables par comparaison avec les images des contrôles sans injection de produit de contraste. Dans les études cliniques, cette distinction entre hyposignaux USPIO et éventuels

remaniements hémorragiques est probablement parfois plus délicate, d'autant plus que des phénomènes inflammatoires secondaires à l'ischémie semblent être largement impliqués dans ces transformations hémorragiques, que ce soit pas le biais de l'activation des métalloprotéinases ((Rosenberg et al., 1998) (Asahi et al., 2001) (Gautier et al., 2003) (Sumii and Lo, 2002) ou celui des altérations oxydatives de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Asahi et al., 2000).

Enfin, certains auteurs ont également évoqué la possibilité d'un marquage intracellulaire non macrophagique. Wu et al. (Wu et al., 2007) ont évalué la prise en charge cellulaire de SPIO (ferumoxide) et d'USPIO (ferumoxtran-10) après injection systémique chez le rat. La capture très faible des USPIO peut être augmentée par administration intraveineuse de sulfate de protamine. Dans ces conditions optimisées, ces auteurs ont mis en évidence un marquage de cellules dendritiques et de lymphocytes B.

En présence de telles incertitudes, le marquage ex vivo de cellules, secondairement injectées et suivies par IRM apparait comme une alternative méthodologique pour étudier la cinétique inflammatoire dans les modèles animaux et sous réserve que cette approche reflète la dynamique des macrophages endogènes.

II. 2) marquage in vitro (ex vivo) et "trafficking"

La préparation in vitro de cellules macrophagiques permet de s'affranchir théoriquement des incertitudes concernant la nature des cellules marquées in vivo (*microglie/macrophage dérivés du sang*), d'autant plus que la résolution spatiale de l'IRM en fait une technique de choix pour le suivi in vivo d'une population cellulaire et de sa migration dans les différents tissus ("cell trafficking "). Cette approche constitue donc une alternative intéressante à l'administration intraveineuse directe du produit de contraste mais coûteuse en manipulations puisqu'elle nécessite prélèvement et/ou cultures des cellules, caractérisation et incubation avec l'agent superparamagnétique. Rappelons que cette internalisation dépend de la dose d'incubation, de la taille des particules (les SPIO sont mieux internalisées que les USPIO) (Metz et al., 2004) et des propriétés de l'enrobage (les VSOP-citratés sont de plus petite taille mais mieux internalisés que les USPIO à enveloppe de carboxydextran) (Fleige et al., 2002). L'association d'un marqueur d'autre nature (immunofluorescent par exemple) peut améliorer la détection et faciliter les confrontations IRM/histologie (Valable et al., 2007).

En fait la plupart des études s'étant intéressées au suivi in vivo de l'infiltration du SNC en condition inflammatoire par de cellules marquées ex vivo, ont utilisé des cellules souches ou

des cellules progénitrices (Bulte et al., 2002; Walczak et al., 2005). Or même in vitro, l'activité d'endocytose des cellules souches, comme celle des lymphocytes T et des DC, n'est pas suffisante pour permettre un marquage compatible avec l'imagerie cellulaire (Kaufman et al., 2003). Les marquages ont été initialement réalisés en exposant les cellules à des doses très importantes de particules en incubation prolongée, avec des risques de toxicité et d'altérations des interactions membranaires par le contact prolongé avec les particules non internalisées. Les différentes équipes ont ainsi développé de multiples techniques visant à favoriser l'internalisation des particules : intégration aux particules de liposomes (Bulte et al., 1993), de lectines (Bulte et al., 1996), utilisant de protéines de translocation (Lewin et al., 2000) ou de dendrimères (Bulte et al., 2001). Des agents de transfection sont maintenant disponibles pour favoriser l'internalisation de particules non modifiées (Daldrup-Link et al., 2003). Arbab et al. (Arbab et al., 2003b) (Arbab et al., 2003a) ont ainsi développé des complexes constitués de ferumoxides et poly-L-Lysine pris en charge très efficacement par des cellules souches hématopoïétiques, sans toxicité ni altérations de leurs capacités fonctionnelles et de différenciation. L'introduction par transgénèse, dans les cellules à marquer, de gènes codant pour un récepteur membranaire du produit de contraste (Weissleder et al., 2000), ou directement pour la synthèse de son propre agent de contraste, vient compléter l'arsenal du marquage cellulaire.

Mais en pratique, seules quelques études ont injecté des cellules inflammatoires ou progénitrices de cellules inflammatoires) marquées ex vivo en condition neuroinflammatoire post-ischémique (voir pour revue (Stoll and Bendszus, 2009)). Stroh et al. ont marqué des cellules mononuclées d'origine splénique avec des "very small superparamagnetic iron oxide" (VSOP) qu'ils ont injectées dans un modèle de tMCAO chez la souris splénectomisée et suivies par IRM à 7T (Stroh et al., 2006). A partir de 24 heures post-ischémie, ils rapportent une chute marquée du signal en périphérie de la lésion et dans les régions calleuses inter-hémisphérique, ainsi qu'à proximité des ventricules latéraux. Cette cinétique et cette localisation de cellules monoclées dérivées du sang est semblable aux résultats obtenus dans les études utilisant un marquage in vivo par injection iv du produit de contraste et notamment ceux de notre équipe (Wiert et al., 2007). Ces régions calleuses et périventriculaires sont favorables au transit cellulaire car elles comportent une riche vascularisation et sont proches de voies anatomiques propices à la migration cellulaire, mise en évidence expérimentalement par transplantation de cellules souches dans l'hémisphère controlatéral ou dans le système cisterno-ventriculaire dans un modèle de lésion ischémique chez le rat (Zhang et al., 2003). Oude Engberink et al. (Engberink et al., 2008) ont eux évalué l'infiltration de monocytes

préalablement marqués par des SPIO (Endorem, Guerbet) et injectés en iv à J5 post-photothrombose chez le rat. Une chute de signal dans la lésion apparaissait clairement à partir de 72 heures post-injection, étayant une fois de plus l'hypothèse d'une infiltration secondaire de cellules mononuclées phagocytaires circulantes. De façon intéressante, au cours de la même expérimentation, les auteurs ont également réalisés sur une série d'animaux des injections iv d'USPIO (Sinerem) également à J5 de la photothrombose. La lésion se réhaussait dès la 2^{ème} heure post-injection d'USPIO avec une prise de contraste maximale à 24h qui régressait par la suite. Ces signaux précoces liés à l'injection systémique d'USPIO, contrastant avec les signaux différés, imputés à l'infiltration des monocytes marqués ex vivo, ont été interprétés comme non spécifiques par ces auteurs. Ces derniers ont dès lors privilégié le marquage ex vivo. Ces constatations, comme celles de signaux précoces dans notre étude pilote (Wiar et al., 2007), font évoquer des processus non spécifiques de passage des USPIO, dont la recherche a motivé la première étude de ce travail de thèse.

III) COMPARAISON AVEC LA TECHNIQUE D'IMAGERIE IN VIVO DE L'ACTIVATION MACROPHAGIQUE PAR TOMOGRAPHIE PAR EMISSION DE POSITRONS (PET)

Nous avons souligné les limites actuelles de l'imagerie cellulaire par IRM avec nanoparticules d'oxyde de fer, représentées d'une part par une faible sensibilité de la méthode IRM (imputable notamment au faible taux de marquage cellulaire in vivo aux concentrations cliniques), et d'autre part, par la faible spécificité de la détection du fer, potentiellement responsable de signaux non spécifiques liés au fer endogène (Weber et al., 2005)

Or, dans la perspective d'applications cliniques, le marquage par injection iv directe d'un produit de contraste est naturellement l'approche privilégiée. Il existe d'autres approches d'imagerie de l'inflammation offrant théoriquement une plus grande sensibilité et spécificité que l'IRM avec nanoparticules de fer. Il s'agit notamment de la tomographie en émission de positrons (TEP) utilisant le ligand 11C(R)PK11195, traceur des récepteurs de type périphérique aux benzodiazépines (PBR). Les cellules du système de phagocytes mononuclées (macrophages et microglie activée) expriment le PBR (Stephenson et al., 1995) (Myers et al., 1991a), mais très faiblement en condition physiologique (Benavides et al., 1983). Le PBR est donc un bon marqueur d'activation phagocytaire du SNC et donc théoriquement de la réaction inflammatoire post-ischémique, comme cela a été mis en évidence expérimentalement dans des modèles focaux (Myers et al., 1991a; Myers et al.,

1991b) (Myers et al, 1991a, b) et globaux d'ischémie cérébrale (Stephenson et al., 1995). Le PK11195 (*isoquinoline carboxamide derivative (1-(2-chlorophenyl)- N-methyl-N-(1-methyl-propyl)-3-isoquinolinecarboxamide*) est un ligand spécifique mais antagoniste du PBR qui a été utilisé pour des analyses autoradiographiques chez le rat ischémié (Benavides et al., 1983; Myers et al., 1991a; Myers et al., 1991b). Plus récemment, des études avec le radiotracer PET le [11C]PK11195 ont été réalisées chez des patients présentant un AVC (Ramsay et al., 1992) (Gerhard et al., 2000; Gerhard et al., 2005; Pappata et al., 2000; Price et al., 2006). Ces récentes études ont notamment montré une augmentation de la fixation du traceur dès le 3^{ème} jour post-AVC au sein de la lésion délimitée par IRM mais également en périphérie de celle-ci (Gerhard et al., 2005)}(Price et al., 2006). Price et al, ont notamment montré que cette fixation s'étendait à l'hémisphère controlatéral et se prolongeait jusqu'au 20^{ème} jour post-ischémie (Price et al., 2006). Ces résultats sont concordants avec l'ébauche d'extension controlatérale via le corps calleux mise en évidence par l'imagerie IRM avec injection d'USPIO dans un modèle expérimental d'ischémie chez la souris (Wiar et al., 2007).

L'approche expérimentale de l'équipe de Schroeter et al. (Schroeter et al., 2009) est également intéressante puisqu'elle utilise l'imagerie par TEP pour étayer les hypothèses issues de leurs études histologiques et IRM avec nanoparticules, concernant l'infiltration tardive des macrophages dérivés du sang dans un modèle d'ischémie permanente chez le rat (Schroeter et al., 1997) (Schroeter et al., 2004). En effet, ces auteurs ont constaté que l'activation macrophagique au 7^{ème} jour post -pMCAO était surtout concentrée en périphérie de la lésion. Leur hypothèse est que dans cette zone périlésionnelle où prédomine l'activation phagocytaire, le flux sanguin est préservé, dans ce modèle d'occlusion permanente. Leur objectif était de caractériser l'état métabolique de ces régions périlésionnelles, où se déroulent les processus inflammatoires afin dévaluer leur risque d'évolution vers des lésions ischémiques secondaires (Schroeter et al., 2009). La problématique clinique sous-jacente est bien sûr celle du pronostic de la pénombre ischémique, qui dépend de son état hémodynamique mais probablement aussi inflammatoire. En utilisant à la fois un traceur métabolique (le [18F]FDG) et le [11C]PK11195, ils ont effectivement montré que la fixation du PK11195, supposée refléter les cellules inflammatoires macrophagiques, était localisé à la zone périlésionnelle, qui s'avérait normoperfusée mais siège d'une nette augmentation du métabolisme glucidique. Ces résultats suggèrent que dans ce modèle, la zone périlésionnelle dont la perfusion est préservée, est le siège d'une intense réaction inflammatoire associée à une consommation énergétique accrue. Cette zone est donc potentiellement à risque de

lésions ischémiques secondaires. Il n'y a pas encore eu à notre connaissance de transposition clinique d'une telle étude.

Il faut noter cependant que la spécificité de la TEP au PK11195 n'est probablement pas parfaite, ce qui conduit à nuancer les résultats de certaines études. En effet, Rojas et al. (Rojas et al., 2007) ont corrélié chez le rat dans un modèle de tMCAO le signal PK11195 en TEP et en autoradiographie et l'expression du PBR par immunohistochimie (protéine) et RT-PCR quantitative (mRNA). Ils ont ainsi montré que la fixation du ligand détecté en TEP *in vivo* était principalement associée à l'expression de PBR par des cellules macrophagiques/microgliales amiboïdes au sein de la lésion alors qu'en périphérie, l'expression phagocytaire du PBR était hétérogène et surtout associée à celle de cellules astrocytaires réactives. Il reste à évaluer la part relative de cette expression astrocytaire de PBR dans la fixation du ligand en TEP, supposée refléter l'activation macrophagique locale et à distance post-ischémique. Cette participation astrocytaire est probablement hétérogène. Si elle prédomine effectivement à distance de la lésion, dans les zones de dégénérescences rétrogrades où siège une gliose réactionnelle, elle pourrait peut-être expliquer les résultats de certaines études. Dans ces études (Myers et al., 1991b; Pappata et al., 2000), une fixation thalamique du traceur après une lésion corticale a conduit certains auteurs à proposer la TEP au PK11195 comme une méthode spécifique et sensible de détection de l'activation *microgliale* à distance versus l'imagerie par IRM avec injection d'USPIO (Jander et al., 2007).

CONCLUSION

En somme, les interactions entre les systèmes nerveux et inflammatoires participent à la physiopathologie des lésions ischémiques cérébrales. Cette réaction inflammatoire post-ischémique est dominée par les cellules mononuclées phagocytaires : *i*) la microglie, cellules immunocompétentes du parenchyme cérébral, et *ii*) les macrophages qui dérivent du sang et infiltrent le tissu cérébral lésé.

Le rôle spécifique de ces macrophages infiltrant n'a été que peu étudié, du fait en particulier des difficultés à distinguer les macrophages infiltrant des cellules microgliales activées. L'imagerie cellulaire par IRM avec injection de nanoparticules superparamagnétiques d'oxydes de fer (USPIO) a contribué à la description dynamique de cette infiltration macrophagique tardive. Cependant, la séquence spatio-temporelle précise de l'activation microgliale et du recrutement macrophagique, intriqués avec des altérations de la barrière hémato-encéphalique au cours des premières heures post-ischémie, reste mal élucidée.

OBJECTIFS

Dans le contexte précédemment décrit, ce travail s'est articulé autour de 2 objectifs :

L'**objectif 1** était de *mieux comprendre la relation entre les signaux IRM après injection d'USPIO et la réaction phagocytaire aux temps précoces post-ischémie dans un modèle d'AVC chez la souris*. Nous avons ainsi principalement interprété les modifications du signal IRM après injection d'USPIO au cours des 24 premières post-ischémie en terme de distribution histologique du Fer.

L'**objectif 2** était *d'étudier les interactions entre les neurones du SNC et les cellules du système des phagocytes mononucléés (microglie et macrophages infiltrant) au cours de la réaction inflammatoire post-ischémique précoce*. Nous avons développé 2 modèles pour étudier ces interactions entre le tissu cérébral ischémié et le système immunitaire : un modèle in vivo d'ischémie globale chez la souris et un modèle in vitro d'hypoxie sur cultures organotypiques d'hippocampe. Ce dernier modèle nous a permis d'analyser les effets de cocultures macrophagiques sur la survie neuronale et microgliale au sein du parenchyme cérébral hypoxié et d'analyser les profils d'expressions cytokiniques impliqués dans ces interactions à médiation humorale.

RESULTATS

La partie **Résultats** est présentée sous forme d'articles publiés ou soumis tentant d'approcher ces 2 objectifs.

ETUDE 1 :
**Interprétation des changements précoces de signal en IRM après injection
d'USPIO**

État de la question et hypothèses:

Au-delà de 24 heures post-ischémie, la plupart des signaux IRM liés aux USPIOs co-localisent indiscutablement avec du Fer intraphagocytaire en histologie. Ce marquage phagocytaire, détecté en IRM grâce aux USPIOs, a été interprété dans les études expérimentales, et par extension dans les essais cliniques, comme correspondant à l'infiltration des macrophages inflammatoires ayant capté le produit de contraste en périphérie. Cette interprétation repose sur deux arguments. Le premier est chronologique : le marquage USPIO est principalement détecté dans la fenêtre temporelle où l'infiltration macrophagique post-ischémique a été mise en évidence par des études utilisant des souris chimériques (2^{ème} Partie § II) 2) b) β)). De plus, l'IRM étant la plupart du temps réalisée 24h après l'injection des USPIOs, les particules étaient supposées avoir quitté le secteur vasculaire (demi-vie de 5h chez le rat). Le deuxième repose sur l'exclusion d'une diffusion passive des particules à la faveur d'une rupture de la BHE (cf 3^{ème} partie § II) 1) a) γ)). Ce dernier argument reste controversé et repose essentiellement sur des résultats négatifs : soit l'absence de mise en évidence d'une altération de la BHE (Rausch et al., 2002) (Denes et al., 2007), soit l'absence de détection histologique de particules libres dans le tissu ischémié (Kleinschnitz et al., 2003). Cependant, l'interprétation du marquage phagocytaire post-ischémique détecté à l'aide des USPIOs requiert l'élucidation des mécanismes d'entrée du produit de contraste dans le parenchyme cérébral. En effet, pour affirmer que le marquage USPIO correspond bien spécifiquement à celui de macrophages circulants ayant infiltré le parenchyme et non à celui de particules libres et/ou de macrophages résidents marqués par les USPIO, il est nécessaire d'exclure une entrée des USPIOs indépendante de l'infiltration macrophagique. Une façon d'aborder ce problème crucial consiste à s'intéresser à l'existence d'éventuels signaux IRM secondaires à l'injection d'USPIO ne pouvant pas être liés à l'infiltration macrophagique car trop précoces par rapport à celle-ci. Effectivement, des altérations précoces du signal consécutives à l'injection intraveineuses des nanoparticules ont été mises en évidence par plusieurs équipes (Engberink et al., 2008; Wiart et al., 2007). Leur interprétation est évidemment sujette à controverses puisqu'elle soulève le problème de la ou des voie(s) d'entrée du produit de contraste et donc de sa spécificité. Cette controverse est illustrée par une lettre à l'éditeur adressée par l'équipe de Bendzus et al. (Bendzus et al.,

2007) concernant les résultats obtenus par notre équipe chez la souris dans un modèle de pMCAO (Wiert et al., 2007). Nous avons notamment mis en évidence dès 6 heures post-ischémie et 1 heure après injection, un hyposignal périlésionnel franc et reproductible persistant au-delà de 72 heures. Pour Bendszus et al. cet hyposignal annulaire périlésionnel correspondrait à la capture des particules dans des microthrombus en cours de constitution. Dans leur modèle de photothrombose, ces auteurs avaient ainsi montré une relation logique entre le moment de l'injection par rapport à la photothrombose et la localisation des hyposignaux (au cœur de la photothrombose si injecté précocément et en périphérie si injecté à la fin de la photothrombose).

Finalement, trois hypothèses ont été proposées pour interpréter les modifications du signal RM liées aux USPIOs :

- 1) les particules injectées en intraveineux pourraient rester localement intravasculaires en raison de leur capture dans des microthrombus notamment (Bendszus et al., 2007; Kleinschnitz et al., 2005),
- 2) les particules pourraient être intraphagocytaires, captées en périphérie par des phagocytes sanguins infiltrant le tissu cérébral ischémié (Kleinschnitz et al., 2003; Petry et al., 2007)
- 3) enfin, les particules pourraient être intersticielles, après avoir diffusé librement à la faveur d'une rupture de la barrière (Engberink et al., 2008).

C'est cette dernière hypothèse que nous avons privilégiée devant la constatation d'une altération précoce de la BHE détectée en IRM par un réhaussement global de la lésion 5 heures après ischémie et immédiatement après injection de gadolinium (Wiert et al., 2007). Cette hypothèse n'est pas incompatible avec la détection intraphagocytaire du Fer à des temps plus tardifs, puisque les particules intersticielles pourraient avoir été secondairement phagocytées par les macrophages résidents du SNC (Bulte and Frank, 2000). Dans notre étude, nous avons confronté les modifications du signal après injection d'USPIOs et la distribution histologique des particules de fer et des cellules phagocytaires pendant les 24 premières heures après occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne chez la souris. Parallèlement, l'état de la BHE a été évalué longitudinalement par IRM et méthode histologique. Une recherche de monocytes circulants ayant phagocyté le produit de contraste, ainsi qu'une étude in vitro de leur captation par des phagocytes dérivés de la moelle osseuse ont complété ce travail.

Apports de l'étude:

Nous avons montré que les modifications précoces de signaux IRM après ischémie et après injection d'USPIO étaient principalement liées à une distribution extracellulaire des particules dans le compartiment vasculaire, interstitiel et dans le LCR. Seuls quelques macrophages résidents du SNC (méningés et périvasculaires) ont phagocyté les USPIO à ces stades précoces post-ischémie.

Nous avons parallèlement mis en évidence des altérations précoces de la BHE.

Par ailleurs, nous n'avons pas détecté de monocytes circulant ayant phagocyté les USPIO dans les 24 heures post-ischémie. In vitro, la captation des particules par des phagocytes dérivés de la moelle osseuse était également extrêmement faible.

En résumé :

L'ensemble de ces résultats suggère que dans ce modèle d'ischémie par pMCAO chez la souris, les modifications de signal précoces après injection d'USPIO reflèteraient principalement des mécanismes non spécifiques d'entrée des particules dans le tissu cérébral ischémié, notamment une diffusion passive à la faveur des altérations de la BHE.

Early-Stage Investigations of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide-Induced Signal Change After Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice

Virginie Desestret, MD; Jean-Christophe Brisset, MSc; Samir Moucharrafié, MD; Emilie Devillard, BSc; Serge Nataf, MD, PhD; Jérôme Honnorat, MD, PhD; Norbert Nighoghossian, MD, PhD; Yves Berthezène, MD, PhD; Marlène Wiart, PhD

Background and Purpose—MR signal changes after intravenous ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) injection are related to inflammatory cells at the subacute stages after focal cerebral injury. However, at the early stages, the interpretation of USPIO-related MR signal alterations remains controversial. Here, we compared MR signal changes after intravenous USPIO injection with the histological iron and macrophage distribution during the first 24 hours in a rodent model of acute stroke.

Methods—Multiparametric MRI at 7T and histological USPIO distribution were confronted from 6 to 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. Blood–brain barrier disruption was assessed using gadolinium MRI and immunoglobulin staining. Prussian blue staining was performed to depict the USPIO brain distribution. USPIO uptake by phagocytes was assessed by immunochemistry on brain tissue, peripheral blood cells, and monocyte cells derived from bone marrow culture.

Results—After USPIO injection, 4 areas of early signal change were observed on every MRI. In all these areas, iron particles were mostly free whether detected in the vascular and cerebrospinal fluid compartments or in the interstitium. Within the first 24 hours, USPIO-loaded cells were not detected in the blood of injured mice or in cultured monocytic cells incubated with USPIO at plasmatic concentration.

Conclusions—These results suggest that, in this model, early reproducible USPIO-related MR signal changes are mainly caused by passive diffusion of free USPIO after blood–brain barrier leakage and by intravascular trapping rather than by peripheral phagocyte infiltration. (*Stroke*. 2009;40:1834-1841.)

Key Words: brain ischemia ■ inflammation ■ magnetic resonance imaging
■ ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide

Neuroinflammation is a crucial pathogenic mechanism in ischemic stroke.¹ Postischemic inflammation is dominated by cells of the mononuclear phagocyte system comprising resident microglia and bloodborne macrophages. Noninvasive monitoring of these cells may improve the understanding of the time course of postischemic brain inflammation. Accordingly, there is a real need for novel imaging techniques, specifically detecting inflammatory cells *in vivo*.

Ultrasmall superparamagnetic nanoparticles of iron oxide (USPIOs) are taken up by mononuclear phagocytic cells after intravenous injection and have been recently introduced as an MRI contrast agent marking macrophages/microglia in inflammatory lesions.² In various models of experimental brain ischemia, accumulation of iron oxide particles has been

observed in the infarct zone during the subacute stages of lesion development.³ After 24 hours postischemia, most iron-related signal changes on MRI are indisputably paralleled by phagocyte-associated iron deposition detected on histology. Recent pilot studies have also used USPIO-enhanced MRI to assess neuroinflammation in human ischemic stroke.^{4,5}

However, at the early stages after experimental focal cerebral ischemia, USPIO-related MRI signal alterations are difficult to interpret.⁶ The exact route of USPIO uptake and brain distribution remains elusive, hampering the interpretation of USPIO-related signals. Three hypotheses have been proposed to explain the MRI signal changes observed after USPIO injection: (1) intravascular trapping of iron particles^{6,7}; (2) USPIO uptake by phagocytes⁸ on the assumption

Received July 9, 2008; final revision received October 26, 2008; accepted November 6, 2008.

From the Université Lyon 1, F-69622 (V.D., J.-C.B., S.M., S.N., J.H., N.N., Y.B., M.W.), Lyon, France; INSA de Lyon, F-69621 (V.D., J.-C.B., E.D., N.N., Y.B., M.W.), Villeurbanne, France; CNRS, UMR5220 (V.D., J.-C.B., E.D., N.N., Y.B., M.W.), Creatis, France; Inserm, U630, (V.D., J.-C.B., E.D., N.N., Y.B., M.W.), Creatis, France; and Inserm, U842 (E.D., S.N., J.H.), Lyon, France.

V.D. and J.-C.B. contributed equally to this work.

Correspondence to Marlène Wiart, PhD, Creatis-LRMN, CNRS 5220, U630 Inserm, Hôpital Neuro-Cardiologique, 28 avenue de Doyen Lepine, 69677 Bron Cedex, France. E-mail marlene.wiart@creatis.univ-lyon1.fr

© 2009 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://stroke.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.531269

that USPIOs are primarily taken up by circulating phagocytes⁹; and (3) interstitial iron particle diffusion into damaged tissue after nonspecific leakage through a disrupted blood–brain barrier.^{10,11}

To assess the acute course of iron particles, MRI signal changes after intravenous USPIO injection were compared with the histological iron and macrophage distribution from 6 to 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in mice.

Materials and Methods

All animal experiments were performed in accordance with institutional guidelines.

Induction of Focal Cerebral Ischemia

Focal cerebral ischemia was induced under anesthesia with 12 mg/kg xylazine and 90 mg/kg ketamine by permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) using an operative microscope as described previously.¹²

Contrast Agents

Ferumoxtran-10 (Sinerem) USPIO contrast agent was provided by Guerbet (Aulnay-sous-Bois, France). A dose of 2 mmol iron/kg body weight (0.15 mL) was injected intravenously into the tail vein 5 hours postinjury.¹³ Sodium chloride 9% (vehicle alone) was used as a control contrast agent. To assess blood–brain barrier (BBB) integrity, DOTA-gadolinium (Dotarem; Guerbet) was administered intravenously at 0.5 mmol/kg.

Protocol

Fifty-one male Swiss mice were included (weight, 25 to 30 g; Charles River, L'Arbresle, France). Of these, 31 were examined both by MRI and histology according to the experimental design detailed in Figure 1. Briefly, animals were imaged before and after contrast agent injection and euthanized after the last MR examination, ie, either at Day 0 (6 hours postinjury) or at Day 1 (24 hours postinjury). On analysis, some USPIO-related hyposignals repeatedly observed on MRI did not correlate with Prussian blue positive staining. An additional set of 15 USPIO-injected mice was therefore studied exclusively by histology, including a different brain preparation procedure (n=8 at 6 hours: 6 pMCAO and 2 controls, and n=7 at 24 hours: 5 pMCAO and 2 controls). To investigate intermediate time points, 5 additional pMCAO mice were euthanized between 8 hours and 13 hours postinjury.

Magnetic Resonance Imaging

MRI was performed at 7T (Bruker Biospec) using a birdcage coil for transmission and a surface coil for reception. For all scans, the field of view was 20×20 mm², slice thickness 1.0 mm, number of slices 15, and matrix size 256×256 (except diffusion matrix: 128×128). The MRI protocol, which lasted approximately 45 minutes, comprised the following scans: gradient-echo (GRE) T1-weighted images (WI): TE/TR=3.5/157.5 ms, $\alpha=50^\circ$; spin-echo T2-WI: TE/TR=75/3000 ms; multi spin-echoes sequence (T2 maps): TE (interecho delay)/TR=11.4/4000 ms, 8 echoes; and diffusion-WI (apparent diffusion coefficient maps): TE/TR=14/2000 ms; *b*-values: 138, 554, and 1060 s/mm².

Histology and Immunohistochemistry

In a first set of experiments, USPIO was detected in cerebral tissue of paraformaldehyde-fixed brains obtained from experimental or control animals that were intracardially perfused with 4% paraformaldehyde.¹³ In a second set of experiments, in an attempt to improve detection of USPIO, brains were removed and snap-frozen after brief intracardiac phosphate-buffered saline perfusion. Immunohistochemistry (rat antimouse F4/80 antibody for microglia/macrophage detection [clone MCA497; Serotec, Oxford, UK], rat anti-

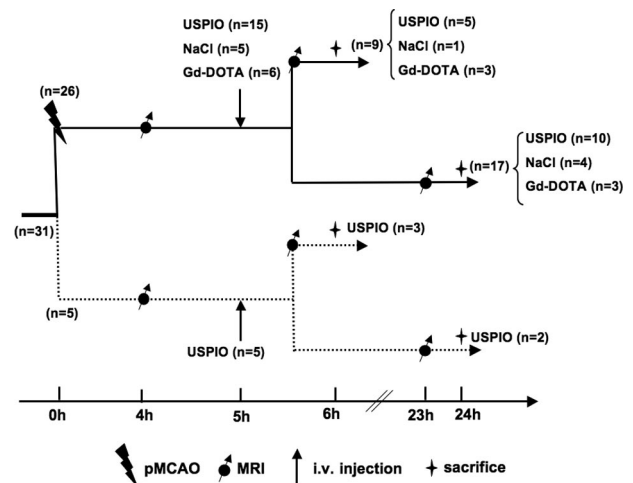


Figure 1. Experimental design.

mouse CD31 antibody for endothelial cell detection [clone MEC13.3; BD Pharmingen, San Jose, Calif]) and/or Prussian blue coloration for USPIO detection were performed on cryostat sections as previously described.¹³ For immunoglobulin deposit detection, brain sections were incubated with biotinylated sheep antimouse secondary antibody and peroxidase activity was visualized using diaminobenzidine supplemented with nickel ammonium sulfate solution. To exclude any background staining due to the presence of endogenous peroxidase, sections were systematically pretreated with 0.3% hydrogen peroxide and methanol for 30 minutes.

Generation and Labeling of Bone Marrow-Derived Macrophages and Monocytic Cells

Total bone marrow (BM) cells flushed out from the tibiae and femur of 12-week-old C57BL/6 mice were cultured as previously described.¹⁴ BM-derived macrophages were then obtained by trypsinizing adherent cells 7 days after plating. Alternatively, BM-derived monocytic cells were obtained by harvesting nonadherent cells 3 days after plating as previously described.¹⁴

Flow Cytometry

Flow cytometry, as described previously,¹⁴ used the conjugated phycoerythrin-labeled anti-cd11b (clone M1/70) Ab (BD Pharmingen).

In Vitro USPIO Labeling

Cell cultures were incubated for 24 hours in absence (vehicle-treated) or in the presence of USPIO (iron concentration=2 mg/mL) or anionic superparamagnetic nanoparticles anionic (iron concentration=1 mmol/L) as a positive cell labeling control (provided by Nano-H, Lyon, France).¹⁵ Immediately after labeling, cells were collected and cytospots were prepared on glass slides with centrifugation.

Analysis of Peripheral Blood Samples

Blood samples were taken from 15 mice. In a first set of experiments, 2 blood samples were taken serially (at 6 hours and 24 hours post-pMCAO) by retro-orbital puncture of 8 mice injected with USPIO. In other experiments, blood samples were taken from 7 pMCAO mice, just before being euthanized, 1 hour after injection of USPIO (n=2) or vehicle alone (n=1) or 19 hours after injection of USPIO (n=2) or vehicle (n=1). Blood samples were then treated by EasyLyse (Dako) to lyse erythrocytes or centrifuged over a Ficoll gradient to eliminate red cells and granulocytes. Cells were then cytospun and assessed for presence of iron particles.

Histochemical Detection of Intracellular Iron in Blood Mononuclear Cells, BM-Derived Macrophages or BM-Derived Monocytic Cells

The presence of iron particles was detected by using Prussian blue staining on cytospun cells. The presence of iron oxide was assessed qualitatively by optical microscopy.

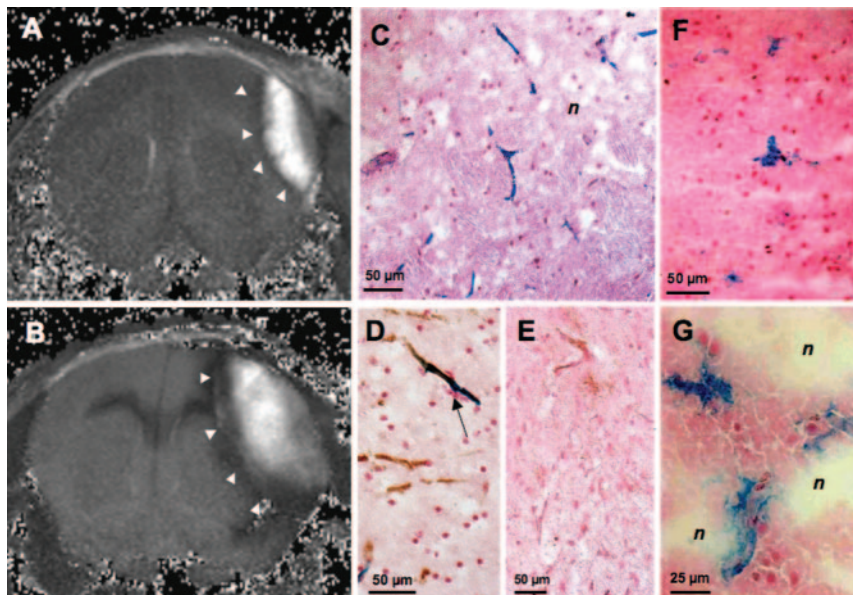


Figure 2. MRI and immunohistochemistry in pMCAO+USPIO mice at 6 hours (top row) and 24 hours (bottom row) in Area I (perilesional area). The axial T2 map showed T2 decrease in the periphery of the lesion (arrowheads: A, at 6 hours; B, at 24 hours). Iron staining by Prussian blue (PB) revealed iron staining in capillaries in the border zone of the necrotic lesion (C). Double staining with PB and anti-CD31 for endothelial cells once again revealed iron staining in vessels (D, arrows). F4/80 immunostaining showed very few positive phagocytes at this early postpMCAO stage (E). In unfixed tissue, sparse spots of PB staining were also detected within the interstitium (F, at 6 hours; G, at 24 hours). n indicates necrotic tissue.

Results

All animals survived the protocol.

USPIO-MR Signals in Focal Cerebral Ischemia

Permanent middle cerebral artery occlusion resulted in a reproducible focal lesion in the ipsilateral dorsolateral cortex detected as an apparent diffusion coefficient decrease and heterogeneous hyperintense signal on T2-WIs on precontrast MRI at 4 hours post-pMCAO.

In all pMCAO+USPIO mice, 4 areas of consistent signal changes were observed on post-USPIO GRE and T2 imaging at 6 hours and 24 hours.

An early marked signal dropout was first detected in the border zone (Area I) of the lesion 1 hour postinjection and persisted 24 hours post-pMCAO (respectively, Figures 2A and 2B).

In the third ventricle and the 2 hippocampus regions (Area II), strongly contrasted hypointense signal lines appeared

early after USPIO injection (Figure 3A–B). The hypointensity of the upper dark line (circled on magnification of Figure 3A–B), which anatomically corresponded to the hippocampal lacunar molecular layer, decreased between Hours 6 and 24, unlike the other hypointense lines of this area, which corresponded anatomically to the velum (arrows on magnification of Figure 3A–B).

Along the lateral ventricles (Area III), signal loss was observed at 6 hours (Figure 4B) and 24 hours post-pMCAO (Figure 4C).

Finally, a hyperintense signal was observed in the corpus callosum (Area IV) on GRE T1-weighted imaging (Figure 3B, arrows) with a corresponding signal decrease on T2 maps (Figures 2B, 4C, and Figure 5I, arrows).

None of the described MR signal alterations were observed in control pMCAO mice not injected with USPIO. These control mice are presented on T1-WI (Figure 5D) and on T2-WI (Figures 4A and 5F–G). In nonoperated USPIO-

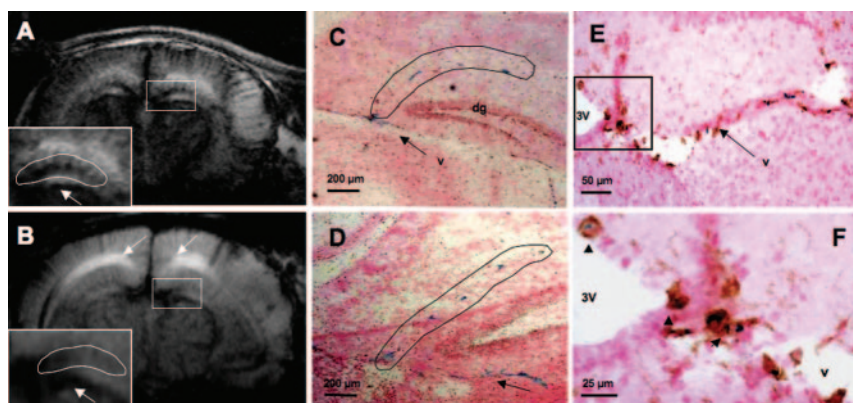


Figure 3. MRI and immunohistochemistry at 6 hours (top row) and 24 hours (bottom row) in pMCAO+USPIO mice in Area II (third ventricle and 2 hippocampi). The axial slice showed GRE signal loss in Area II (box: A, at 6 hours; B, at 24 hours) on magnification in the inset with corresponding arrow and circle on histology (C–D). Note the hypersignal (T1 enhancement) in the corpus callosum at 24 hours post-pMCAO (arrows) in B. PB revealed iron particles in vessels of the hippocampal lacunar molecular layer (circled in C–D; dg, dentate gyrus). Arrows in C and D show iron staining in the velum interpositum (v). Double staining with F4/80 and Prussian blue showed sparse USPIO-labeled macrophages in the periependymal zone of the third ventricle (E and on magnification [box] in F) and in the periependymal region of the third ventricle (3V).

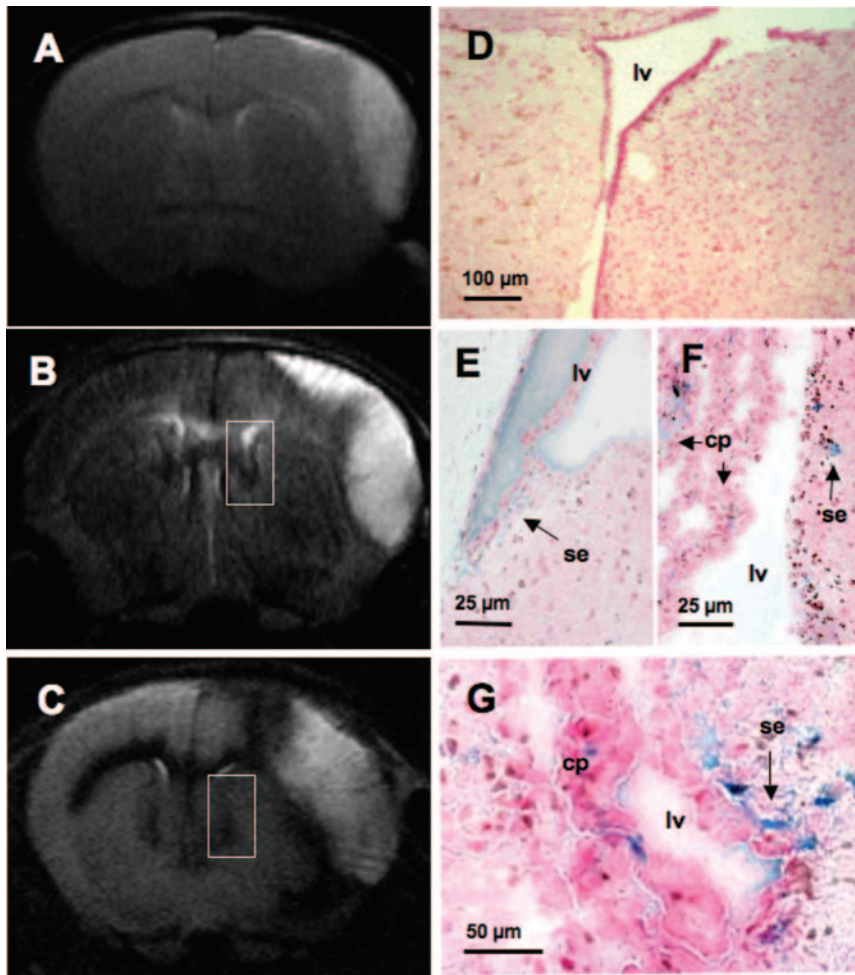


Figure 4. MRI and immunohistochemistry at 6 hours (2 top rows) and 24 hours (bottom row) in pMCAO+USPIO mice in Area III (wall of the lateral ventricles). The axial T2-weighted slice before (A) and 1 hour (B) and 19 hours (C) after USPIO injection showed T2 decrease along the lateral ventricles (box). F4/80 immunostaining detected few phagocytes in this area (D). Prussian blue staining (E–G) on unfixed tissue revealed iron deposits in the lumen of the lateral ventricle (lv), in the subependymal region (arrow, se), and the choroid plexus (cp).

injected control mice, organized signal loss, anatomically corresponding to vessels, was seen on GRE imaging after injection at 6 hours and, to a lesser extent, at 24 hours.

Histological Distribution of Iron and Phagocytes in Each Area of USPIO-MR Signal Change

Iron particles were exclusively observed in the areas of reproducible MR signal change after USPIO injection and not in any other part of the brain.

Area I: Perilesional Zone

In the perilesional zone, iron staining was visualized exclusively within the blood vessels at 6 hours (Figure 2C) and 24 hours (Figure 2D) in all fixed brains. Vascular localization was furthermore demonstrated by double staining with anti-CD31 for endothelium visualization (Figure 2D). Very few F4/80+ phagocyte cells were present in the perilesional area at these early stages postischemia (Figure 2E) in line with a previous study.¹³ In the current work, these F4/80+ phagocyte cells were always without iron particles. The unfixed procedure confirmed this vascular localization, but also showed some sparse interstitial Prussian blue staining (extracellular and extravascular; Figure 2F–G).

Area II: Third Ventricle and Hippocampus Regions

In this area, at 6 hours and 24 hours, iron staining was present in the vena (Figure 3C–D, arrows), which correspond to

prolongations of the pia matter in the brain bathed by cerebrospinal fluid (CSF) and containing vessels. Iron staining was also detected in the vessels of the lacunar molecular layers of the hippocampi (Figure 3C–D). The unfixed brain procedure was clearly better for visualizing free iron particles in this area (in 100% of brains versus 45% in fixed tissue). Using double staining with F4/80 antibody for phagocytes on fixed tissue, few iron-labeled macrophages were detected in the periventricular zone of the third ventricle (Figure 3E–F) or in the vena interposita (perivascular and meningeal phagocytes).

Area III: Along the Lateral Ventricles

In this area, iron particles were not observed in the lumen of the ventricle of fixed brains. In contrast, iron staining was detected in the ventricle and the choroid plexus of all unfixed brains (Figure 4E–F) at 6 hours post-pMCAO. In half of these unfixed brains, interstitial iron particles were also detected in the subependymal region (Figure 4E–F).

At 24 hours, iron staining of the choroid plexus remained intense, whereas lumen iron staining disappeared with both fixation procedures. In contrast, the subependymal diffusion increased at 24 hours. As already seen in the border zone of the lesion, very few F4/80+ phagocyte cells were present at these early postischemia stages (Figure 4D) and always without iron particles.

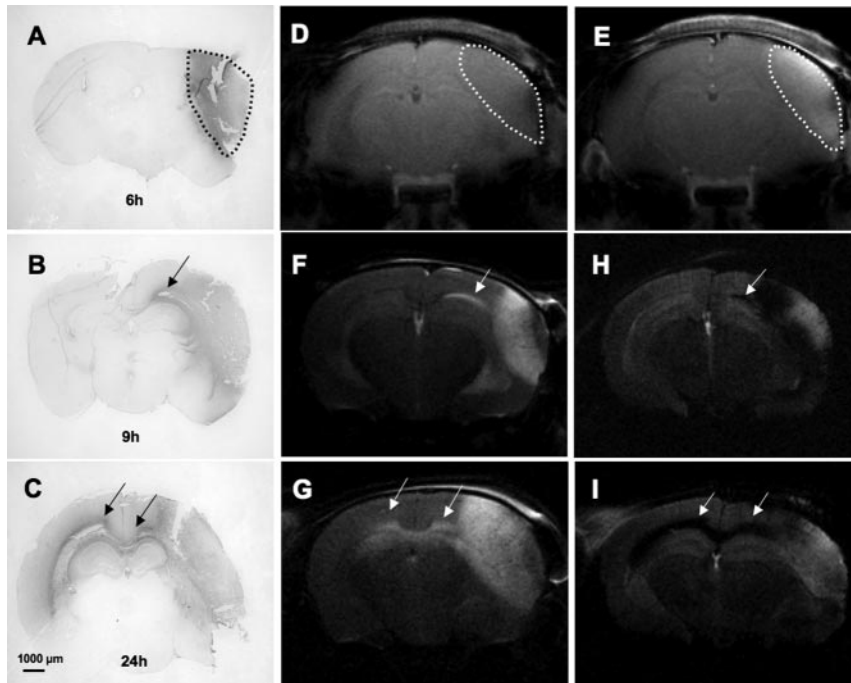


Figure 5. Correlation between early BBB disruption with IgG leakage (left column) and the spatiotemporal pattern of MR signal change (median and right column) in Area IV (corpus callosum [CC]). IgG leakage was initially confined to the lesion (circled in A, at 6 hours post-pMCAO), then to the ipsilateral CC (arrow in B), and finally spread to the whole CC (C). Early BBB breakdown was assessed by enhancement after DOTA-gadolinium (DOTA-Gd) injection on an axial GRE T1-weighted slice (D, before DOTA-Gd; E, after). Axial T2-weighted slice of pMCAO without USPIO mice showed a hyperintense signal in the lesion (vasogenic edema) and along the ipsilateral CC (arrow in F) at 6 hours and in the whole CC at 24 hours (G). The axial T2-weighted slice of pMCAO+USPIO mice showed USPIO-induced signal loss at the periphery of the lesion and in the ipsilateral CC (arrow in H) at 6 hours and in the whole CC at 24 hours (I).

Area IV: Corpus Callosum

Surprisingly, no iron staining was observed in the first 24 hours post-pMCAO whether on fixed or unfixed tissue despite a marked and reproducible iron-related MR signal. At 6 hours, there were some F4/80-positive cells in the ipsilateral corpus callosum. F4/80 immunostaining increased at 24 hours with marked phagocyte staining in the whole corpus callosum (data not shown), but without iron particles.

Histological Distribution of USPIO and Phagocytes in Control Mice

In nonoperated USPIO-injected mice, iron staining was observed in vessels and the vascular stroma of the choroid plexus on histology. There was no iron staining in the parenchyma, vessels, or CSF compartments (ventricles, vena) in noninjected mice. In pMCAO mice without USPIO injection, like in pMCAO+USPIO mice, very few F4/80+ phagocyte cells were present at these early postischemia stages in the border zone of the lesion. Likewise, there were only a few F4/80-positive cells in the ipsilateral corpus callosum at 6 hours in pMCAO mice with marked phagocyte staining in the whole corpus callosum at 24 hours.

Assessment of Early BBB Disruption and Diffusion of Immunoglobulins

To test the hypothesis of USPIO leakage through a damaged BBB, the relationships between USPIO-induced signal change on the one hand and presence of a vasogenic edema and BBB integrity on the other were assessed. MRI analysis after DOTA-gadolinium injection showed T1 enhancement of the lesion over time and allowed early BBB breakdown to be demonstrated in the whole lesion at 6 hours (Figure 5D–E) and also at 24 hours. On histology, IgG immunostaining was performed to visualize plasma molecules that had entered the brain through a disrupted BBB. IgG immunostaining in the

lesion (Figure 5A) and along the corpus callosum (Figure 5B–C) was colocalized with (1) vasogenic edema detected as hyperintensity on T2-weighted images at 6 hours (Figure 5F: lesion and ipsilateral corpus callosum, arrow) and 24 hours (Figure 5G: ipsilateral and contralateral corpus callosum, arrows) in pMCAO mice; and (2) T2 decrease after USPIO injection in pMCAO+USPIO mice (Figure 5H: perilesion and ipsilateral corpus callosum, arrow and Figure 5I: ipsilateral and contralateral corpus callosum, arrows).

USPIO Not Detected in Blood Mononuclear Cells in the First 24 Hours Postinjury

Prussian blue staining of peripheral blood mononuclear cell cytosols did not detect any iron-stained mononuclear cells in blood samples taken in the first 24 hours postinjury in injected mice (data not shown).

Very Weak USPIO Uptake by BM-Derived Monocytic Cells or BM-Derived Macrophages

Analyzing the ability of blood monocytes to ingest USPIO *in vitro* is difficult; specific culture conditions are required, including adherence to plastic, that alter monocyte functions.¹⁶ Here, USPIO uptake capacity was compared in 2 myeloid cell populations: BM-derived monocytic cells, which can be considered as immediate precursors of blood monocytes, and BM-derived macrophages. BM culture phenotypes were assessed by fluorescence activated cell sorting analysis (Figure 6A–B). After 24 hours with USPIO, no USPIO uptake by monocytic cells was observed and very little if any by BM-derived macrophages (Figure 6C–D, respectively). In contrast, USPIO uptake was detectable after 48 hours of incubation (data not shown) and BM-derived macrophages and monocytic cells efficiently ingested anionic superparamagnetic nanoparticles (Figure 6E–F).

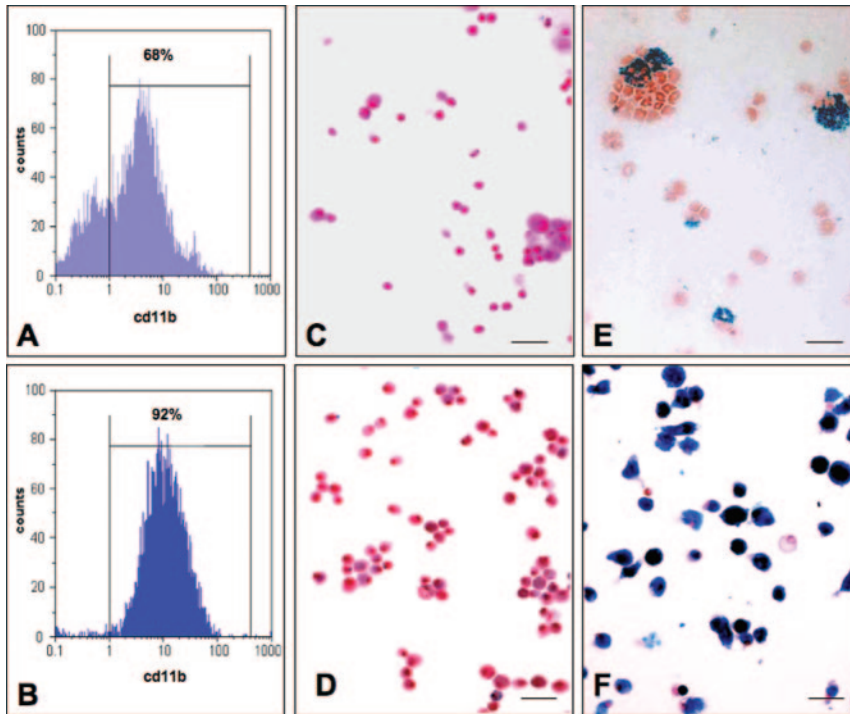


Figure 6. Assessment of USPIO uptake by BM-derived monocytic cells (top row) or BM-derived macrophages (BMDM; bottom row). Flow cytometry analysis of BM-derived cells showed that a great majority of cells (respectively, 68% of BM-derived monocytic cells in A and 92% of BMDM in B) expressed the pan-myeloid marker CD11b (the vertical bar indicates the threshold of fluorescence positivity as compared with control). No USPIO labeling was detected in BM-derived monocytic cells incubated 24 hours with USPIO as shown in C (bar=20 μ m). Weak USPIO uptake can be detected in sparse BMDM incubated with USPIO (D). As a positive control of phagocytic activity, BM-derived monocytic cells were incubated with anionic superparamagnetic nanoparticles (AMNP). E, Prussian blue staining showed that a subpopulation of monocytic cells had ingested nanoparticles. F, Almost all BMDM cells had ingested nanoparticles.

Discussion

The present study observed consistent MRI signal changes after intravenous USPIO injection at 6 hours and 24 hours postinjury. Histological analysis showed that iron staining was mostly associated with the vascular and CSF compartments. Interestingly, at early time points, only brain phagocytes in contact with CSF had already phagocytized USPIO. USPIO-loaded cells were not detected in the blood of injured mice within the first 24 hours. In addition, cultured monocytic cells derived from BM cultures did not display phagocytic activity toward USPIO after 24 hours of incubation at plasmatic concentration. This suggests that, in this specific model of pMCAO, early USPIO enhancement in the brain is mainly caused by nonspecific mechanisms such as BBB leakage and intravascular trapping rather than by peripheral phagocyte infiltration.

It has been claimed that USPIO-enhanced MRI essentially reflects the recruitment of blood-circulating USPIO-loaded monocytes into inflamed tissue, thus demonstrating late-stage inflammation.^{4,8} The present study shows that, at an early stage after experimental stroke, USPIO-induced MR alterations are not related to the recruitment of bloodborne USPIO-loaded macrophages. This result is in agreement with previous studies demonstrating that recruitment of bloodborne macrophages (derived from blood monocytes) was not observed during the early stages of experimental ischemia.^{17,18} We also observed, in line with other work,¹¹ that USPIOs were poorly, if at all, phagocytized by BM-derived monocytic cells (precursors of blood monocytes) and BM-derived macrophages. These data suggest that the *in vivo* uptake of USPIO by mononuclear phagocytes depends notably on the intrinsic ability of each phagocyte population to ingest USPIO. Thus, blood monocytes, brain resident macrophages, infiltrating inflammatory macrophages, or parenchy-

mal microglia probably do not ingest USPIO equally efficiently or with the same kinetics. In addition, USPIO uptake may vary depending on the state of activation of these various phagocytic cells.¹⁹ It cannot be ruled out that, during later stages, monocytes or a subpopulation of activated and/or inflammatory monocytes²⁰ acquire the ability to phagocytize USPIO. However, our results demonstrate that USPIO-induced MR alterations do not univocally reflect the entry of USPIO-loaded monocytes in the ischemic brain. They further suggest that, at early postischemia time points, USPIOs penetrate in the central nervous system as free particles, BBB disruption being attested by the presence of both gadolinium-enhanced lesions and immunoglobulin deposits. Accordingly, although detection of free USPIOs is probably hampered by standard histological analysis procedures (in vivo perfusion, fixatives, multiple baths), extracellular uptake of USPIO particles within the central nervous system parenchyma of ischemic brains was detectable. Because the interstitial fluid of brain parenchyma is drained into the CSF compartment, our data suggest that USPIOs may circulate as free particles from blood to brain parenchyma and from brain parenchyma to CSF. This hypothesis is further supported by the detection of USPIO in meningeal macrophages (comprising those residing in the velum) and periependymal microglia, 2 populations of brain-resident phagocytes that localize in CSF-bathed areas. The detection of USPIOs in perivascular macrophages is also in accordance with the presence of free USPIOs in the interstitial fluid. Indeed, perivascular macrophages, more than microglia, have been shown to quickly phagocytize antigens and particles circulating in the interstitial fluid of brain parenchyma.²¹ Also, providing that free USPIO particles gain access to the CSF, it may be hypothesized that they subsequently penetrate periventricular parenchyma areas and are taken up by activated microglia. It is

noteworthy in this regard that, after the first 48 hours after experimental stroke, USPIOs are detected in the cytoplasm of microglial cells that localize in periventricular parenchymal areas.¹³ Finally, free USPIO particles may also enter the CSF compartment through an altered blood/CSF barrier at the level of the choroid plexi.

A hyperintense signal was observed on T1-weighted GRE images in the corpus callosum on Day 1 in pMCAO+USPIO mice exclusively in line with a previous study.¹³ However, surprisingly, we did not obtain any iron staining in this location. Failure to detect iron particles in the corpus callosum might be due to the well-documented lack of sensitivity of Prussian blue to interstitial USPIO (as opposed to iron compartmentalized in vessels or in cells).^{22,23} There are indeed a number of indirect indications of the presence of free USPIOs in the corpus callosum: hyperintensity on T1-WI²⁴ and IgG immunostaining in spatiotemporal agreement with signal change on T2-WI after USPIO injection. Taken together, these data suggest that USPIO have diffused along with edematous fluid, probably after nonspecific leakage secondary to BBB disruption. This result further underlines the fact that free USPIOs cannot be definitely asserted to be absent in tissue simply on the grounds of lack of positive Prussian blue staining. Fluorescent iron oxide nanoparticles and/or electronic microscopy may help validate this hypothesis in the future.

Despite abundant evidence of an inflammatory response after stroke, anti-inflammatory treatment has so far failed in clinical trials.²⁵ In this context, noninvasive detection of inflammatory cells after brain ischemia could be helpful (1) to select patients who may benefit from anti-inflammatory treatment; and/or (2) to target the potential therapeutic time window. For this purpose, MRI coupled with USPIO, a contrast agent thought to be taken up by macrophages *in vivo*, appears a promising tool to provide noninvasive information about neuroinflammation. In early clinical studies,^{26,27} no USPIO enhancement was observed 24 hours to 48 hours after USPIO injection or 2 to 4 days after stroke onset in most patients, whereas MR signal changes were consistently observed in studies performed at 5 to 6 days after stroke.^{4,5} The heterogeneous patterns of USPIO enhancement between patients are probably critically dependent on the timing of contrast agent injection relative to stroke onset, but also on the time window of the subsequent MRI scans. Altogether our results demonstrate that further investigation will be necessary to analyze patients' MRIs with USPIO at early stages after stroke onset. In this perspective, the development of new MR strategies allowing unambiguous discrimination of free USPIOs versus USPIO-labeled cells as well as systematic investigation of potential pitfalls in MR data interpretation are clearly needed to validate the interest of the USPIO-enhanced MRI in larger cohorts.

Acknowledgments

We thank Claire Corot of Guerbet for providing the USPIO and for fruitful discussions. We also thank Rhône-Alpes Genopole and Fondation Rhône-Alpes Futur, funded by the Réseau National des Genopoles.

Sources of Funding

This research was supported in part by the Fondation pour la Recherche sur le Cerveau, by Cluster 11 of the Rhône-Alpes Region, by the European I-Know project (European commission, 6th Framework program), and by a grant from the Institut Fédératif des Neurosciences de Lyon (IFR19). It was also supported by an ANR INFLAM grant.

Disclosures

None.

References

- Muir KW, Tyrrell P, Sattar N, Warburton E. Inflammation and ischaemic stroke. *Curr Opin Neurol*. 2007;20:334–342.
- Corot C, Petry KG, Trivedi R, Saleh A, Jonkmanns C, Le Bas JF, Blezer E, Rausch M, Brochet B, Foster-Gareau P, Baleriaux D, Gaillard S, Dousset V. Macrophage imaging in central nervous system and in carotid atherosclerotic plaque using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. 2004;39:619–625.
- Jander S, Schroeter M, Saleh A. Imaging inflammation in acute brain ischemia. *Stroke*. 2007;38:642–645.
- Saleh A, Schroeter M, Jonkmanns C, Hartung HP, Modder U, Jander S. In vivo MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke. *Brain*. 2004;127:1670–1677.
- Nighoghossian N, Wiart M, Cakmak S, Berthezene Y, Derex L, Cho TH, Nemoz C, Chapuis F, Tisserand GL, Pialat JB, Trouillas P, Froment JC, Hermier M. Inflammatory response after ischemic stroke: a USPIO-enhanced MRI study in patients. *Stroke*. 2007;38:303–307.
- Bendszus M, Kleinschnitz C, Stoll G. Iron-enhanced MRI in ischemic stroke: intravascular trapping versus cellular inflammation [Letter]. *Stroke*. 2007;38:e12.
- Kleinschnitz C, Schutz A, Nolte I, Horn T, Frank M, Solymosi L, Stoll G, Bendszus M. In vivo detection of developing vessel occlusion in photothrombotic ischemic brain lesions in the rat by iron particle enhanced MRI. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25:1548–1555.
- Kleinschnitz C, Bendszus M, Frank M, Solymosi L, Toyka KV, Stoll G. In vivo monitoring of macrophage infiltration in experimental ischemic brain lesions by magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:1356–1361.
- Petry KG, Boiziau C, Dousset V, Brochet B. Magnetic resonance imaging of human brain macrophage infiltration. *Neurotherapeutics*. 2007;4:434–442.
- Bulte JW, Frank JA. Imaging macrophage activity in the brain by using ultrasmall particles of iron oxide. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000;21:1767–1768.
- Engberink RD, Blezer EL, Hoff EI, van der Pol SM, van der Toorn A, Dijkhuizen RM, de Vries HE. MRI of monocyte infiltration in an animal model of neuroinflammation using SPIO-labeled monocytes or free USPIO. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;28:841–851.
- Rupalla K, Allegrini PR, Sauer D, Wiessner C. Time course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathol*. 1998;96:172–178.
- Wiart M, Davoust N, Pialat JB, Desestret V, Moucharaffie S, Cho TH, Mutin M, Langlois JB, Beuf O, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezene Y. MRI monitoring of neuroinflammation in mouse focal ischemia. *Stroke*. 2007;38:131–137.
- Davoust N, Vuillat C, Cavillon G, Domengot C, Hatterer E, Bernard A, Dumontel C, Jurdic P, Malcus C, Confavreux C, Belin MF, Nataf S. Bone marrow CD34+/B220+ progenitors target the inflamed brain and display in vitro differentiation potential toward microglia. *FASEB J*. 2006;20:2081–2092.
- Billotey C, Wilhelm C, Devaud M, Bacri JC, Bittoun J, Gazeau F. Cell internalization of anionic maghemite nanoparticles: quantitative effect on magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*. 2003;49:646–654.
- Petit-Bertron AF, Pedron T, Gross U, Coppée JY, Sansonetti PJ, Cavaillon JM, Adib-Conguy M. Adherence modifies the regulation of gene expression induced by interleukin-10. *Cytokine*. 2005;29:1–12.
- Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*. 2003;183:25–33.

18. Denes A, Vidyasagar R, Feng J, Narvainen J, Mc Coll BW, Kauppinen RA, Allan SM. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:1941–1953.
19. von zur Muhlen C, von Elverfeldt D, Bassler N, Neudorfer I, Steitz B, Petri-Fink A, Hofmann H, Bode C, Peter K. Superparamagnetic iron oxide binding and uptake as imaged by magnetic resonance is mediated by integrin receptor Mac-1 (CD11b/CD18): implications on imaging of atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 2007;193:102–111.
20. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19:71–82.
21. Kida S, Steart PV, Zhang ET, Weller RO. Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages. *Acta Neuropathol.* 1993;85:646–652.
22. Rausch M, Baumann D, Neubacher U, Rudin M. In-vivo visualization of phagocytotic cells in rat brains after transient ischemia by USPIO. *NMR Biomed.* 2002;15:278–283.
23. Stroh A, Zimmer C, Werner N, Gertz K, Weir K, Kronenberg G, Steinbrink J, Mueller S, Sieland K, Dirnagl U, Nickenig G, Endres M. Tracking of systematically administrated mononuclear cells in the ischemic brain by high-field magnetic resonance imaging. *Neuroimage.* 2006;33:886–897.
24. Brisset JC, Desestret V, Marcellino S, Devillard E, Lagarde F, Nataf S, Nighoghossian N, Berthezene Y, Wiart M. T1 and T2 quantification of free USPIO and USPIO-labeled macrophages at 4.7T and 7T. 16th annual meeting of the ISMRM; Toronto, Ontario, Canada; May 3–9, 2008.
25. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007;87:179–197.
26. Saleh A, Schroeter M, Ringelstein A, Hartung HP, Siebler M, Modder U, Jander S. Iron oxide particle-enhanced MRI suggests variability of brain inflammation at early stages after ischemic stroke. *Stroke.* 2007;38:2733–2737.
27. Cho TH, Nighoghossian N, Wiart M, Desestret V, Cakmak S, Berthezene Y, Derex L, Louis-Tisserand G, Honnorat J, Froment JC, Hermier M. USPIO-Enhanced MRI of neuroinflammation at the sub-acute stage of ischemic stroke: preliminary data. *Cerebrovasc Dis.* 2007;24:544–546.

ETUDE 2 :

Effets de l'hypoxie sur les cellules neurales et interaction avec les macrophages sanguins

État de la question :

La réaction macrophagique post-ischémique possède deux composantes : une activation de la microglie résidente et un recrutement de macrophages dérivés du sang (Gelderblom et al., 2009). Les échanges entre le système immunitaire périphérique représenté par les phagocytes dérivés du sang et les cellules neurales (notamment microgliales et neuronales) ischémisées sont susceptibles d'influencer la survie neuronale post-ischémique. Ces interactions se déroulent très précocement et conditionnent le recrutement des leucocytes sanguins sur le site neuro-inflammatoire central. En effet, sur le versant périphérique de ces échanges, l'ischémie cérébrale se manifeste par des modifications rapides de la composition inflammatoire cellulaire et moléculaire sanguine et des organes du système immunitaire périphérique (Offner 2009). Ce recrutement leucocytaire est en partie au moins orchestré par les chimiokines émises par les cellules neurales lésées, notamment le MIP-1 α (Wang et al., 2008a) et donc dépendantes des lésions centrales ischémiques.

Dans une 1^{ère} partie de l'étude, nous nous sommes intéressés au versant central de ces échanges en évaluant l'impact de l'hypoxie sur les cellules résidentes du parenchyme cérébral. En effet, si la perte neuronale hippocampique post-hypoxique a clairement été mise en évidence dans divers modèles in vitro et in vivo, la susceptibilité des cellules microgliales aux conditions hypoxiques sévères reste controversée (comme détaillé dans les rappels des données parfois contradictoires de la littérature 2^{ème} partie §II) 2) b) ϵ)).

Nous avons donc étudié la survie neuronale et microgliale précoce dans 2 modèles d'hypoxie sévère :

- un **modèle in vitro d'hypoxie par privation en glucose et oxygène (OGD) sur cultures organotypiques hippocampiques**. Il s'agit d'une approche expérimentale reproductible et validée permettant d'évaluer la perte et les interactions cellulaires au sein d'une structure tissulaire cérébrale respectée (Gahwiler 1997, Neuman 2006).

- un **modèle in vivo d'hypoxie globale chez la souris par occlusion bicarotidienne transitoire**. Il s'agit là aussi d'un modèle validé d'atteinte ischémique hippocampique (cf 1^{ère} partie §IV.1.c).

Dans une 2^{ème} partie, nous nous sommes intéressés aux échanges humoraux précoces entre les cellules macrophagiques périphériques et le tissu cérébral ischémié.

Pour cela, nous avons étudié les effets de **co-cultures macrophagiques** sur la survie neuronale post-hypoxique dans le **modèle in vitro d'OGD sur OHC** (EPHE E. Devillard). Les co-cultures primaires de macrophages dérivés de la moelle osseuse sont mises en contact humoral via un surnageant commun avec le tissu hippocampique ischémié. Cette approche expérimentale permet d'analyser les effets « humoraux » des phagocytes dérivés de la moelle osseuse exposés aux molécules solubles sécrétées par le tissu cérébral ischémié. Ces conditions expérimentales permettent également d'étudier de façon séparée les 2 compartiments (central et périphérique) et d'analyser par RT-PCR les profils d'expressions cytokiniques impliqués dans ces interactions à médiation humorale.

Apports de l'étude:

Dans ces 2 modèles d'hypoxie sévère hippocampiques, nous avons mis en évidence une perte précoce et concomitante neuronale et microgliale.

Nous avons observé un effet neuroprotecteur sur la perte neurale post-hypoxique des co-cultures macrophagiques. Cet effet à médiation humorale des macrophages co-cultivés avec les tranches hypoxiées est associé à un profil d'activation de type M2, caractérisée notamment par la surexpression d'arginase-1 (inhibant l'activité de l'iNOS).

En somme

Notre étude montre que les cellules microgliales sont sensibles précocément à l'hypoxie, in vitro et in vivo, comme les neurones.

Ces résultats suggèrent que le tissu hippocampique hypoxié synthétiserait des facteurs solubles induisant un profil macrophagique M2 chez les macrophages périphériques qui exerceraient alors un effet neuroprotecteur.

Macrophages but not endogenous microglia efficiently prevent ischemia-induced neuronal cell death

Virginie Desestret ^{1,2,3}, Emilie Devillard ⁴, René Ferrera ^{3,5}, Catherine Rey ⁶, Marie Chanal ⁴, Denis Angoulvant ^{2,3,5}, Jérôme Honnorat ^{2,3,4}, Norbert Nighoghossian ^{1,2,3} and Serge Nataf ^{2,3,4}

¹INSERM Unit CREATIS; ²Hospices Civils de Lyon (Lyon University Hospital); ³University Lyon-1; ⁴INSERM U842; ⁵INSERM U886; ⁶IFR 19

ABSTRACT

The clinical outcome of cerebral ischemia is thought to particularly depend on the behavior of innate immune cells belonging to myeloid lineage. These include notably CNS-resident microglia and peripheral or CNS-infiltrating macrophages. However, the full range of functions exerted by these cell types in cerebral ischemia is still matter of debate. To get insights into the complex crosstalk that establishes between microglia, hypoxic neurons and macrophages, we set up an *in vitro* model where primary macrophages were co-cultured with hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation (OGD). Results showed that, under these experimental conditions, cultured macrophages afforded partial protection from OGD-induced neuronal cell loss through a paracrine mechanism. Surprisingly, macrophages co-cultured with oxygen/glucose-deprived slices engaged a M2-type activation program characterized notably by the induction of Arginase-1 expression. Results also indicated that failure of endogenous microglia to protect hypoxic neurons was related to a partial depletion of microglia under ischemic conditions. Supporting this view, such a microglial susceptibility to ischemia-induced cell death was also demonstrated *in vivo* in a model of global cerebral ischemia. Our results shed a new light on the role of peripheral macrophages under conditions of cerebral ischemia and raise the possibility of using combination of M2-type cytokines as therapeutic agents.

INTRODUCTION

During cerebral ischemia, inflammatory events taking place within and outside the central nervous system (CNS) are considered to play a major pathophysiological role (1-4). The clinical outcome of stroke may depend in particular on the behavior of two categories of immune myeloid cells, namely CNS-infiltrating macrophages and CNS-resident microglia (5-7). However, there are still uncertainties with regard to the full range of functions exerted by these two cell types in stroke. Indeed, microglia were initially shown to support and amplify the mechanisms of hypoxia-induced neuronal cell death (6, 7). Similarly, CNS-infiltrating macrophages were found to alter the survival of hypoxic neurons through a T cell-dependent mechanism (8). However, recent findings suggested that microglia provide significant neuroprotection in a model of focal cerebral ischemia (5). Along the same line, alternatively-activated macrophages, also referred to as M2 macrophages, were shown to support neurorepair in various models of CNS lesions (9, 10). Besides these functional aspects, the kinetics of microglial accumulation and macrophages in the ischemic brain is also matter of debate. Thus, contrary to a commonly admitted view, several studies demonstrated that a non-neglectable proportion of microglia do not expand but actually engage apoptosis at early time points following global or focal cerebral ischemia (5, 11-13). Similar findings were depicted in human brain hypoxic lesions secondary to cardiac arrest (14). Furthermore, microglial vulnerability to ischemia/hypoxia was also demonstrated by several *in vitro* studies (15, 16). Finally, with regard to the kinetics of macrophage infiltration, there is only recent evidence that such a process occurs early (during the first 24h) during the course of focal cerebral ischemia (17, 18). In contrast, in global cerebral ischemia, no study firmly demonstrated such an infiltration although several works suggested an impact of peripheral leukocytes, including possibly macrophages, on neuronal survival (19, 20). There is thus accumulating evidence that

under conditions of cerebral ischemia, microglia, hypoxic neurons and macrophages engage a complex cross-talk that dictate, at least partly, the extent of neuronal cell loss.

In the present study, we attempted to model *in vitro* such a dialogue by co-culturing primary macrophages with hippocampal slices that were submitted to oxygen and glucose deprivation (OGD). Data indicated that under these experimental conditions, cultured macrophages engage an M2 activation program and afford partial protection from OGD-induced neuronal cell loss through a paracrine mechanism. Results also showed that microglia is susceptible to hypoxia-induced cell death *in vitro* as well as *in vivo* in a model of global cerebral ischemia.

MATERIALS AND METHODS

Animals:

All animal investigations were conformed with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Protocol approval was granted by our university ethics review board (Claude Bernard University, Lyon 1, Lyon, France).

Organotypic hippocampal cultures (OHC)

Hippocampal slices were prepared from seven-day-old C57Bl6J mice (Charles River France) as described previously (21-23). Briefly, hippocampi were rapidly removed under sterile conditions, placed into ice-cold medium and cut into transverse slices (200 μ m thick) using a Mc Illwain tissue chopper. Slices were then cultured on semipermeable membrane inserts (Millipore, Bedford, MA), in six-wells culture plates containing 1 ml culture medium per well (composition: 50% of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen), 25% normal horse serum, 25% Hank's Buffer Salt Solution, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin

and 6.5 mg/mL glucose). OHC were cultured for 2 days at 37°C in a 5% CO₂ enriched atmosphere until oxygen-glucose deprivation was performed.

Oxygen-glucose deprivation (OGD)

Slices were washed three times in serum- and glucose-deprived medium (75% basal medium essential, 25% Hank's Buffer Salt Solution, 1% L-glutamine) before being transferred into a hypoxic chamber (95% N₂, 5% CO₂). Hypoxia was performed by incubating OHC in an air-tight glass humidified chamber (Verretech, Lyon, France) at 37°C ventilated with N₂ 95% + CO₂ 5%. OHC were subjected to OGD during 30 min at 37°C and then further cultured for 2 days in serum-free glucose-replete medium (75% basal medium essential, 25% Hank's Buffer Salt Solution, 2% B27, 1% L-glutamin and 6,5 mg/mL glucose) under normoxic conditions, as previously described (22). When needed, OHC were co-cultured for 2 days with bone-marrow derived macrophages after OGD was performed. In these experiments, bone marrow-derived macrophages were cultured on the plastic surface of 6-wells plates so that no physical contact could be established with the hippocampal slices cultured on permeable membrane inserts.

Primary cultures of bone marrow-derived macrophages

Two-to-5-month-old female C57Bl/6 mice (Charles River) were sacrificed by intraperitoneal injection of pentobarbital and bone marrow cells were harvested by flushing out tibias and femurs. Total bone marrow cells were then seeded on uncoated 6-wells plates at 5x10⁵ cells/ml in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Invitrogen) supplemented with 15% fetal calf serum (Fetal Clone II, Hyclone), penicillin-streptomycin (1 µg/ml) and 10 ng/ml human macrophage-colony stimulating factor (hM-CSF, PreproTech Inc). Cultures were incubated at 37°C in a moist 5% CO₂-95% air atmosphere. Seven days after plating, non-adherent cells were harvested and adherent cells were washed twice in PBS before being co-

cultured with hippocampal slices in serum-free glucose-repleted medium, as described above. When needed, bone marrow-derived macrophages were stimulated with murine Interferon- γ (50 ng/ml) (PrepoTech Inc) for 18h or murine Interleukin-4 (50 ng/ml) (PrepoTech Inc) for 48h in order to generate M1 classically-activated macrophages or M2 alternatively-activated macrophage respectively, as previously described (20, 21). Otherwise, bone marrow-derived macrophages were not further stimulated and were referred to as M0 macrophages. Purity of macrophage cell cultures under these experimental conditions were repeatedly found to reach more than 95% as assessed by immunocytofluorescence or FACS analysis of CD11b + cells (data not shown).

Induction of transient global cerebral ischemia by bilateral carotid artery occlusion

C57Bl/6 male mice (Charles River France) aged 10 to 14 weeks were deeply anesthetized using a combination of xylazin (12 mg/kg) and ketamine (90 mg/kg). Global cerebral ischemia was then induced by performing a bilateral carotid artery occlusion (BCAO) under an operative microscope. Briefly, both common carotid arteries were exposed, separated carefully from the vagus nerves, and occluded for 20 min with micro-clips. The level of blood flow during the occlusion and following reperfusion after removal of the clips was checked visually. The rectal temperature was monitored and maintained at $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ using feedback-controlled heating-pad (BIOSEB, Vitrolles, France). An incandescent light was placed over the head of mice from the induction of anaesthesia until 3 h after ischemia to avoid biased results due to hypothermia. Control mice consisted in sham-operated mice that were deeply anesthetized and had their carotids exposed but not occluded.

Immunohistofluorescence

Following oxygen-glucose deprivation, hippocampal slices were further cultured for 48h under normoxic and nomoglycemic conditions before being examined by immunofluorescence. Hippocampal slices or, alternatively, 12 μ m-thick brain cryostat sections obtained from operated mice, were fixed with 4% paraformaldehyde (for NeuN staining), or absolute ethanol (for CD11b staining) for 10 min at room temperature. Tissues were rinsed 3 times in PBS and incubated for 30 min at room temperature with a blocking solution consisting of 4% bovine serum albumin diluted in PBS and supplemented with 10% normal goat serum. Hippocampal slices or brain sections were then incubated overnight at 4°C with a rat anti-mouse CD11b antibody (clone M1/70, BD Pharmingen), or a mouse anti-mouse neuronal nuclei (NeuN) antibody (Chemicon International). Antibodies were diluted 1:100 in blocking solution. Tissues were then rinsed 3 times in PBS and incubated with a biotinylated goat anti-mouse or goat anti-rat antibody (Molecular Probes) for 1h at room temperature. After 3 washes, tissues were finally incubated with streptavidin-Alexafluor (488 or 506, Molecular probes) diluted 1:100 in PBS. 4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Roche) staining of nucleus was performed and slides mounted using Fluoroprep (BioMerieux). For double staining experiments, brains sections were fixed in ethanol and stainings for CD11b and NeuN were performed sequentially over 3 days following the procedures describe above.

Image analysis

To assess neuronal cell loss in hippocampal slices or brain tissue sections, we measured the surface covered by NeuN staining in the dentate gyrus (for hippocampal slices) or in the pyramidal layer of CA1 (for brain sections). Images from selected areas were digitally photographed under high magnification using a fluorescent microscope (Zeiss Axioplan II)

coupled with a CDD camera (F-View II; Soft Imaging System). Image analysis was then performed using an image analysis software (analySIS 3.0; Soft Imaging System). A region of interest (ROI) was first defined and measured in each selected area (dente gyrus or pyramidal layer). Then, the area occupied by NeuN staining was determined by automatically measuring the surface area of pixels that were above a threshold value. Finally, the area of NeuN immunostaining was then indexed to the total area covered by the ROI, allowing thus density of NeuN staining to be estimated. The same protocol was applied for the assessment of microglial density in brain tissue sections except that CD11b staining was analyzed and that ROI were defined in the pyramidal layer and the stratum radiatum of the CA1.

Flow cytometry analysis of OHC

Slices were pooled in pairs, mechanically dissociated and cells were re-suspended in ice-cold PBS containing 2% fetal calf serum (FCS). Cells were incubated for 30 min at 4°C with blocking CD16/CD32 monoclonal antibody (BD Pharmingen). After washing, cells were then incubated for 30 min at 4°C with phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD11b (clone M1/70, BD Pharmingen). Cells were then washed once in PBS and fixed with 1% paraformaldehyde before analysis by flow cytometry on a Galaxy flow cytometer (Partec, Germany) with FlowMax software (Partec, Germany).

mRNA extraction and retrotranscription (RT)

mRNA were extracted with RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) from macrophages that had been co-cultured with OHC, M0 macrophages (unstimulated), M1 macrophages or M2 macrophages. Total RNA (20 ng) was then reverse transcribed and cDNA amplified using QuantiTect Whole Transcriptome Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Real-time Quantitative Reverse Transcription PCR (Q-RT-PCR)

The cDNA synthesized was measured using Q-RT-PCR (SYBR Green PCR, LightCycler, Roche Diagnostics Indianapolis) following the manufacturer's recommendations. The LightCycler experimental run protocol consisted of an initial Taq activation at 95 °C, 8min followed by a "touch down" PCR step of 12 cycles consisting of 15 s at 95 °C, 5 s at 68 °C, and 8 s at 72 °C, followed by 45 cycles consisting value. A melting curve step was used to examine each sample for purity and specificity. Primers were designed with Primer3 software (Whitehead Institute/MIT, USA) and purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). The following primers were used: Arginase 1 primers: forward 5' TCACCTGAGCTTGATGTCG 3', reverse 5' TTCCAAGAGTTGGGTTAC 3'; IL-6primers: forward 5' CTGACAATATGAATGTTGGG 3', reverse 5' TCCAAGAAACCATCTGGCTAGG 3'; Inductible nitric oxide synthase (NOS2): 5' AAGCTGAACTTGAGCGAGGA 3', reverse 5' TGCCCATAGGAAAAGACTG 3'; TNF- α : forward 5' CTTGTTGCCTCCTCTTTTGC 3', reverse 5' AATGACCCGTAGGGCGATTA 3'. All primers had T_m 's between 59 and 61 °C and all the products were 100–200 bp. The internal standards used to control amplification variations due to differences in the starting mRNA concentration were cyclophilin A mRNA. The relative mRNA levels for each tissue were computed from the threshold cycle (Ct) values obtained for the target gene, the efficiency of the primer set, and cyclophilin mRNA levels in mouse samples using RealQuant software (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany, version 1.01).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Student's t tests when values presented a normal distribution or, otherwise, using Wilcoxon non parametric test.

RESULTS

Macrophages prevent hypoxia-induced neuronal cell death in vitro

In organotypic hippocampal cultures (OHC) submitted to oxygen-glucose deprivation (OGD), neuronal cell loss could be demonstrated in different populations of hippocampal neurons, as assessed by NeuN staining (Fig 1 A-D) or DAPI coloration (data not shown). While the extent of neuronal cell loss was variable from one experiment to another, granular neurons of the dentate gyrus were constantly affected by OGD (Fig 1 B, D). However, bone marrow-derived macrophages co-cultures had a striking protective effect on oxygen/glucose deprived hippocampal neurons (Fig 1E-F). Such an effect was quantified by measuring the mean percentage of surface covered by NeuN staining in the dentate gyrus of control OHC, OHC submitted to OGD (hypoxia) or OHC submitted to OHC and co-cultured with macrophages (hypoxia+macrophages). In each experiment (n=3), measures obtained in control OHC were given the arbitrary value of 100% and all other measures were expressed as a percentage of this value. As compared to controls, we found that neuronal survival reached $34.8 \pm 8\%$ in hypoxic slices and $69.4 \pm 10\%$ in hypoxic slices co-cultured with macrophages (Fig 1G). This represents a nearly 100% increase in neuronal cell survival under conditions of bone marrow-derived macrophages co-cultures.

Hippocampal slices submitted to hypoxia trigger an M2 activation program in macrophages

We then assessed macrophages co-cultures with regard to their cytokine profile. For that purpose, the expression of genes involved in M1 activation program (TNF-alpha, IL-6, iNOS) or M2 activation program (Arginase-1) was examined by Q-RTPCR (Fig 2). We compared results with those obtained in M1 macrophages, M2 macrophages or unstimulated macrophages (referred to as M0 macrophages). Results showed that as opposed to M1

macrophages, bone marrow-derived macrophages co-cultured with oxygen/glucose-deprived OHC expressed low amounts of TNF- α , IL-6 and iNOS mRNAs. In contrast, similarly to M2 macrophages, macrophages co-cultured with oxygen/glucose-deprived OHC expressed high levels of Arginase-1 mRNA. These results indicate thus that oxygen/glucose-deprived OHC triggered an M2 activation program in co-cultured macrophages. Interestingly, such an activation with regard to cytokine synthesis was accompanied by morphological signs of macrophage activation such as rounding up of cells and the formation of macrophage clusters (data supplement).

Microglia are depleted in hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation

We then hypothesized that activation of endogenous microglia had been somehow impaired in oxygen/glucose-deprived OHC, explaining a lack of neuroprotective effect exerted by endogenous microglia. Immunohistological analysis of CD11b⁺ cells indicated that microglial density was substantially decreased in oxygen/glucose-deprived OHC as compared to control OHC (Fig 3 A-B). As image analysis of immunohistological stainings was hampered by the ramified morphology and high density of microglial cells, we performed a flow cytometry analysis of mechanically-dissociated OHCs allowing the percentage of microglial cells to be precisely quantified in hippocampic slices (Fig 3 C-F). Data showed that the percentage of microglial cells reached 9.6 ± 1.6 % in oxygen/glucose-deprived slices as compared to 13.8 ± 1.2 % in control slices ($p < 0.05$, Wilcoxon test).

Hippocampal microglia are depleted in vivo after global ischemia

To assess *in vivo* the relevance of our *in vitro* findings, we chose to analyze the behavior of hippocampal microglia in a model of global cerebral ischemia induced in adult mice by bilateral carotid occlusion (BCAO). The mortality rate of the model reached 20%. Surviving mice (n=16) were sacrificed 24h following BCAO and only mice displaying clinical signs at

the time of sacrifice (clumsiness in forelimbs \pm circling or leaning), were further analyzed by immunohistology (n=9). Ischemic hippocampic lesions were bilateral and asymmetric. For each clinically disabled animal, we included in histological analysis the more damaged hippocampus but excluded from the analysis brain samples that presented obvious signs of extended necrosis under macroscopic examination or following histological analysis. Under these experimental conditions, we found a dramatic microglial depletion in BCAA mice (n=9) in the stratum radiatum layer of hippocampal CA1 subfield, a large hippocampal area that, in control animals (n=5), presented a high microglial density (Fig 4). In contrast, microglial density appeared unchanged in the pyramidal layer of BCAA animals, as compared to controls (Fig 4). When performing a quantitative analysis, we observed that along an expected neuronal cell loss in the pyramidal layer of CA1 in BCAA compared to sham (0.187 ± 0.08 versus 0.47 ± 0.06 , $p < 0.001$), microglial density was indeed strikingly and overall decreased in the hippocampus of BCAA mice compared to sham animals (0.12 ± 0.02 versus 0.04 ± 0.02 , $p < 0.001$). This decrease of the microglial density in BCAA mice compared to sham is particularly marked in the stratum radiatum of the CA1 (0.12 ± 0.02 versus 0.03 ± 0.02 , $p < 0.001$) (Fig 5).

DISCUSSION

In the last decade, the concept of macrophage activation programs has shed a new light on the roles exerted by the mononuclear phagocyte system under diverse pathological conditions (24-26). Beside the classical activation program, which can be induced by lipopolysaccharide (LPS) or Interferon- γ (IFN- γ) macrophages may engage different types of alternative activation programs (also known as M2 programs) that were shown to favor tissue repair, to

dampen acute inflammation or, in the case of tumor-infiltrating macrophages, to support tumor outgrowth (24-26). Signals that trigger such alternative activation programs are likely delivered in the local environment of tissue-infiltrating macrophages and include notably IL-4 and IL-10. In our experimental setting, hippocampal slices submitted to hypoxia released soluble factors that triggered a M2-type activation program in co-cultured bone marrow-derived macrophages. Although additional studies are needed to clarify the nature of these factors, preliminary data indicated that IL-10, a potent activator of M2 macrophages, was upregulated in organotypic hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation (data not shown). Similarly, the neuroprotective effects exerted by macrophages on oxygen/glucose-deprived OHC rely on paracrine mechanisms that need to be deciphered. In this view, it has to be noticed that insulin growth factor-1 (IGF-1), a cytokine known to be synthesized by M2-macrophages, was previously shown to prevent ischemia-induced neuronal cell death (27, 28). With regard to the overall neuroprotective effects of M2 macrophages, our results are in line with previous works showing that: i) IL-4-stimulated alternatively-activated microglia stimulates oligodendroglialogenesis (29), ii) infiltrating blood-derived macrophages express a M2 phenotype and support tissue repair in a model of spinal cord injury (10). However, to our knowledge, this is the first study demonstrating the efficiency of M2 macrophages in protecting neurons submitted to ischemia. Such an effect, mediated by soluble factors, appears reminiscent to the neuroprotection afforded by bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on oxygen/glucose-deprived OHC (30). They suggest that BMSCs and M2 macrophages may support the survival of hypoxic neurons through common paracrine mechanisms.

Another important point of our work relates with the demonstration of microglial vulnerability to ischemia. Similar findings were previously described *in vitro* (15, 16) and *in vivo* under conditions of global cerebral ischemia (13, 14). Interestingly, we were not able to

evidence an increased expression of M2-type genes in the hippocampus of BCAA mice, on day 1 following ischemia (data not shown). It is thus thinkable that in BCAA mice, microglial depletion along with a relative poorness of macrophage recruitment may partly condition neuronal cell loss. Our results further suggest that ischemia-induced microglial alterations, in terms of both cell viability and functions, may have been underestimated in models of focal cerebral ischemia that more closely mimic stroke. Confounding factors include in particular the migration of microglia from non-ischemic adjacent areas and/or CNS infiltration by blood-borne macrophages and microglial-like cells. Supporting this view, several works previously demonstrated that ischemia-induced microglial cell death actually occurs *in vivo* in models of focal cerebral ischemia (5, 11, 12).

Overall, our study shows that endogenous microglia is vulnerable to cerebral ischemia and that M2 activated macrophages may exert neuroprotective effects under ischemic conditions. These results raise the possibility of using combination of M2-type cytokines as therapeutic agents in stroke. Identifying the optimal time-window and cytokine candidates for such therapeutic approach is of major importance.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the ANR “INFLAM” and by a grant from the Fondation pour la Recherche pour le Cerveau (FRC).

REFERENCES

1. Iadecola, C., and Alexander, M. (2001) Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol* 14, 89-94
2. Baird, A. E. (2006) The forgotten lymphocyte: immunity and stroke. *Circulation* 113, 2035-2036
3. Offner, H., Subramanian, S., Parker, S. M., Afentoulis, M. E., Vandenbark, A. A., and Hurn, P. D. (2006) Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 654-665
4. Hurn, P. D., Subramanian, S., Parker, S. M., Afentoulis, M. E., Kaler, L. J., Vandenbark, A. A., and Offner, H. (2007) T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1798-1805
5. Lambertsen, K. L., Clausen, B. H., Babcock, A. A., Gregersen, R., Fenger, C., Nielsen, H. H., Haugaard, L. S., Wirenfeldt, M., Nielsen, M., Dagnaes-Hansen, F., Bluethmann, H., Faergeman, N. J., Meldgaard, M., Deierborg, T., and Finsen, B. (2009) Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J Neurosci* 29, 1319-1330
6. Hughes, P. M., Allegrini, P. R., Rudin, M., Perry, V. H., Mir, A. K., and Wiessner, C. (2002) Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 308-317
7. Chen, Y., Hallenbeck, J. M., Ruetzler, C., Bol, D., Thomas, K., Berman, N. E., and Vogel, S. N. (2003) Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 748-755
8. Shichita, T., Sugiyama, Y., Ooboshi, H., Sugimori, H., Nakagawa, R., Takada, I., Iwaki, T., Okada, Y., Iida, M., Cua, D. J., Iwakura, Y., and Yoshimura, A. (2009) Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med* 15, 946-950
9. Takahashi, K., Prinz, M., Stagi, M., Chechneva, O., and Neumann, H. (2007) TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis. *PLoS Med* 4, e124
10. Shechter, R., London, A., Varol, C., Raposo, C., Cusimano, M., Yovel, G., Rolls, A., Mack, M., Pluchino, S., Martino, G., Jung, S., and Schwartz, M. (2009) Infiltrating

- blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med* 6, e1000113
11. Mabuchi, T., Kitagawa, K., Ohtsuki, T., Kuwabara, K., Yagita, Y., Yanagihara, T., Hori, M., and Matsumoto, M. (2000) Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 31, 1735-1743
 12. Velier, J. J., Ellison, J. A., Kikly, K. K., Spera, P. A., Barone, F. C., and Feuerstein, G. Z. (1999) Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci* 19, 5932-5941
 13. Petito, C. K., Olarte, J. P., Roberts, B., Nowak, T. S., Jr., and Pulsinelli, W. A. (1998) Selective glial vulnerability following transient global ischemia in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 231-238
 14. Love, S., Barber, R., Srinivasan, A., and Wilcock, G. K. (2000) Activation of caspase-3 in permanent and transient brain ischaemia in man. *Neuroreport* 11, 2495-2499
 15. Lyons, S. A., and Kettenmann, H. (1998) Oligodendrocytes and microglia are selectively vulnerable to combined hypoxia and hypoglycemia injury in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 521-530
 16. Chock, V. Y., and Giffard, R. G. (2005) Development of neonatal murine microglia in vitro: changes in response to lipopolysaccharide and ischemia-like injury. *Pediatr Res* 57, 475-480
 17. Clausen, B. H., Lambertsen, K. L., Babcock, A. A., Holm, T. H., Dagnaes-Hansen, F., and Finsen, B. (2008) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. *J Neuroinflammation* 5, 46
 18. Gelderblom, M., Leypoldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C. U., Siler, D. A., Arumugam, T. V., Orthey, E., Gerloff, C., Tolosa, E., and Magnus, T. (2009) Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 40, 1849-1857
 19. Spencer, S. J., Mouihate, A., and Pittman, Q. J. (2007) Peripheral inflammation exacerbates damage after global ischemia independently of temperature and acute brain inflammation. *Stroke* 38, 1570-1577

20. Lee, H. W., Koo, H., Choi, K. G., Park, K. D., and Lee, B. C. (1999) The effects of peripheral leukocytes on the hippocampal neuronal changes in transient global ischemia and unilateral cerebral hemispheric infarction. *J Korean Med Sci* 14, 304-314
21. Stoppini, L., Buchs, P. A., and Muller, D. (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37, 173-182
22. Neumann, J., Gunzer, M., Gutzeit, H. O., Ullrich, O., Reymann, K. G., and Dinkel, K. (2006) Microglia provide neuroprotection after ischemia. *Faseb J* 20, 714-716
23. Neumann, J., Sauerzweig, S., Ronicke, R., Gunzer, F., Dinkel, K., Ullrich, O., Gunzer, M., and Reymann, K. G. (2008) Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *J Neurosci* 28, 5965-5975
24. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23, 549-555
25. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686
26. Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23, 344-346
27. Dluzniewska, J., Sarnowska, A., Beresewicz, M., Johnson, I., Srail, S. K., Ramesh, B., Goldspink, G., Gorecki, D. C., and Zablocka, B. (2005) A strong neuroprotective effect of the autonomous C-terminal peptide of IGF-1 Ec (MGF) in brain ischemia. *Faseb J* 19, 1896-1898
28. Rizk, N. N., Myatt-Jones, J., Rafols, J., and Dunbar, J. C. (2007) Insulin like growth factor-1 (IGF-1) decreases ischemia-reperfusion induced apoptosis and necrosis in diabetic rats. *Endocrine* 31, 66-71
29. Butovsky, O., Landa, G., Kunis, G., Ziv, Y., Avidan, H., Greenberg, N., Schwartz, A., Smirnov, I., Pollack, A., Jung, S., and Schwartz, M. (2006) Induction and blockage of oligodendrogenesis by differently activated microglia in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116, 905-915
30. Sarnowska, A., Braun, H., Sauerzweig, S., and Reymann, K. G. (2009) The neuroprotective effect of bone marrow stem cells is not dependent on direct cell contact with hypoxic injured tissue. *Exp Neurol* 215, 317-327

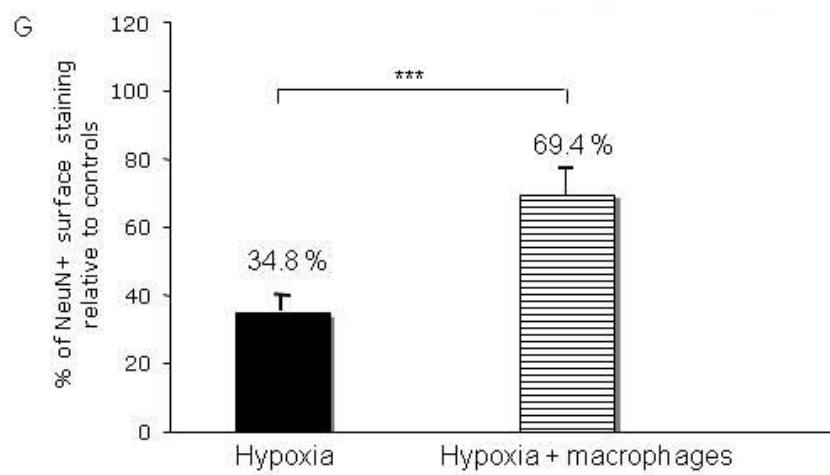
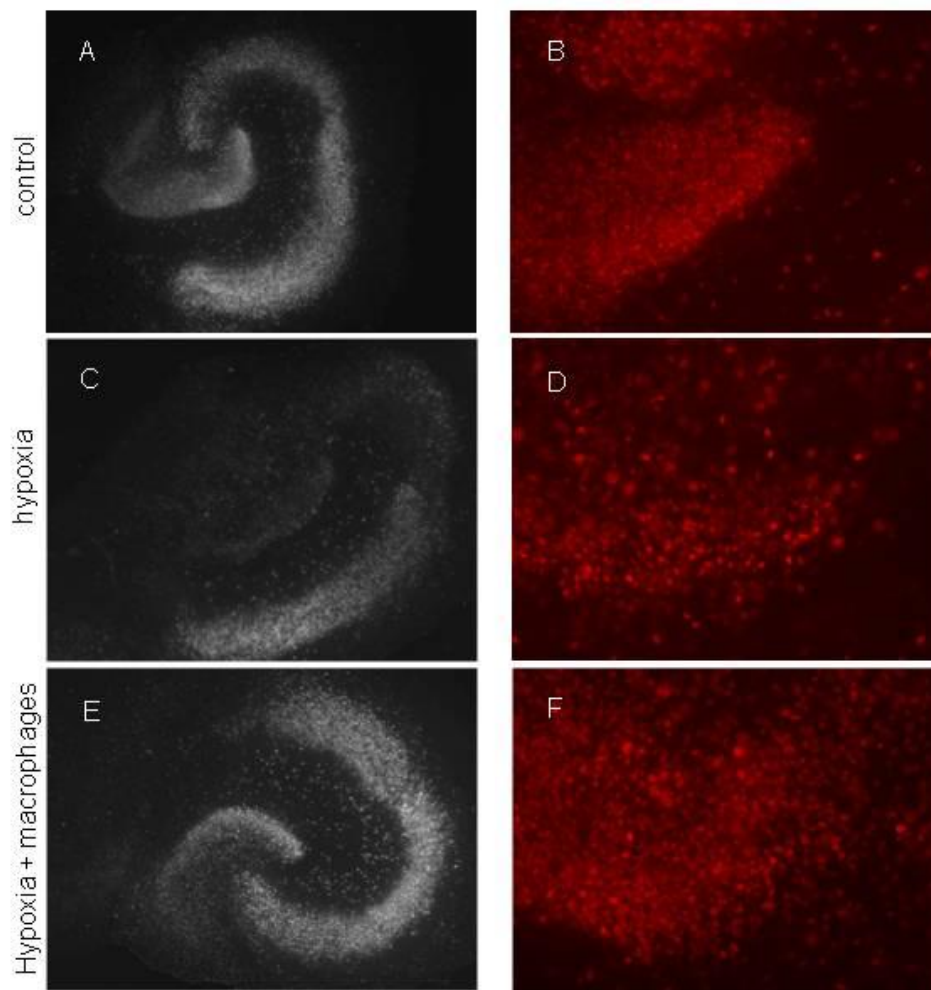


Figure 1

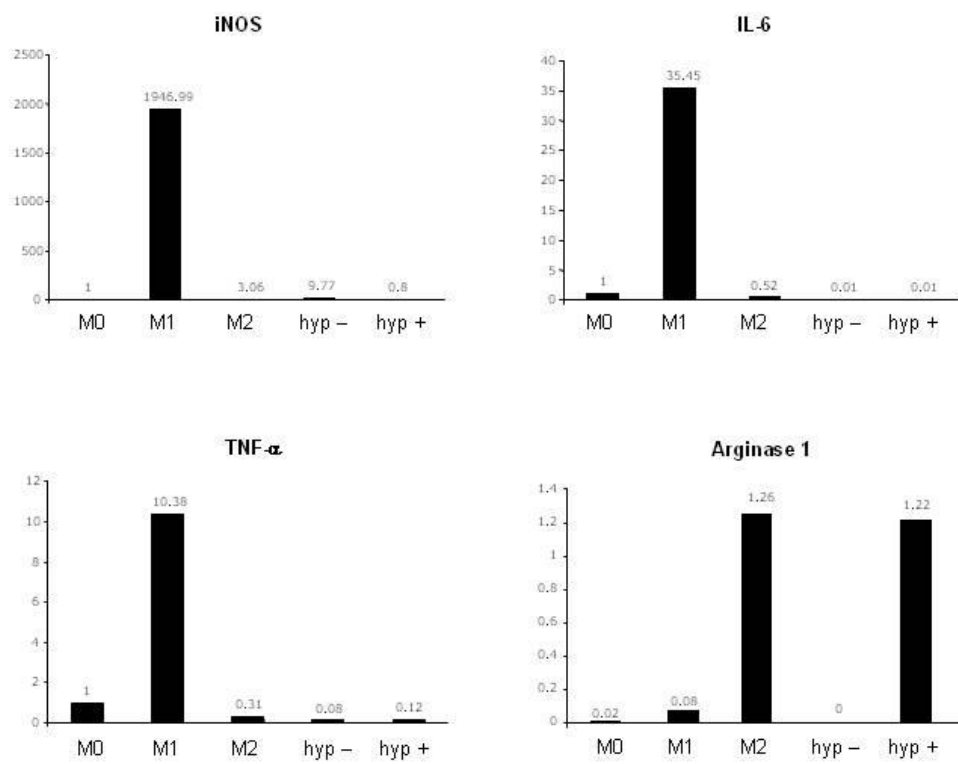


Figure 2

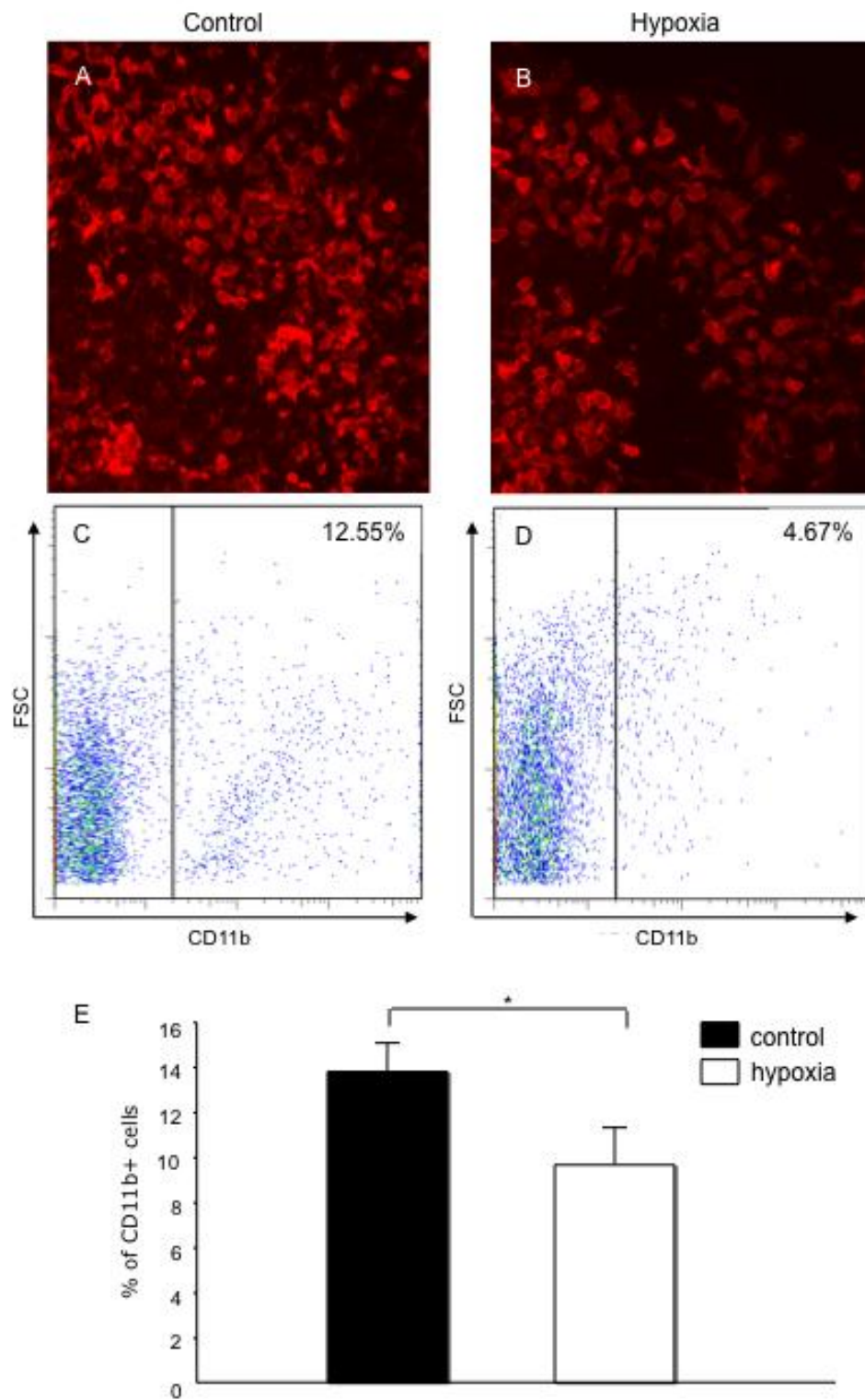


Figure 3

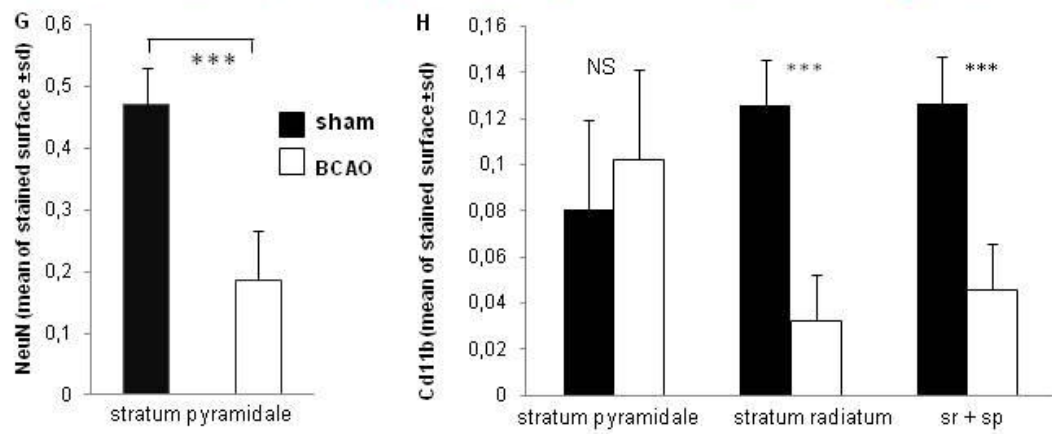
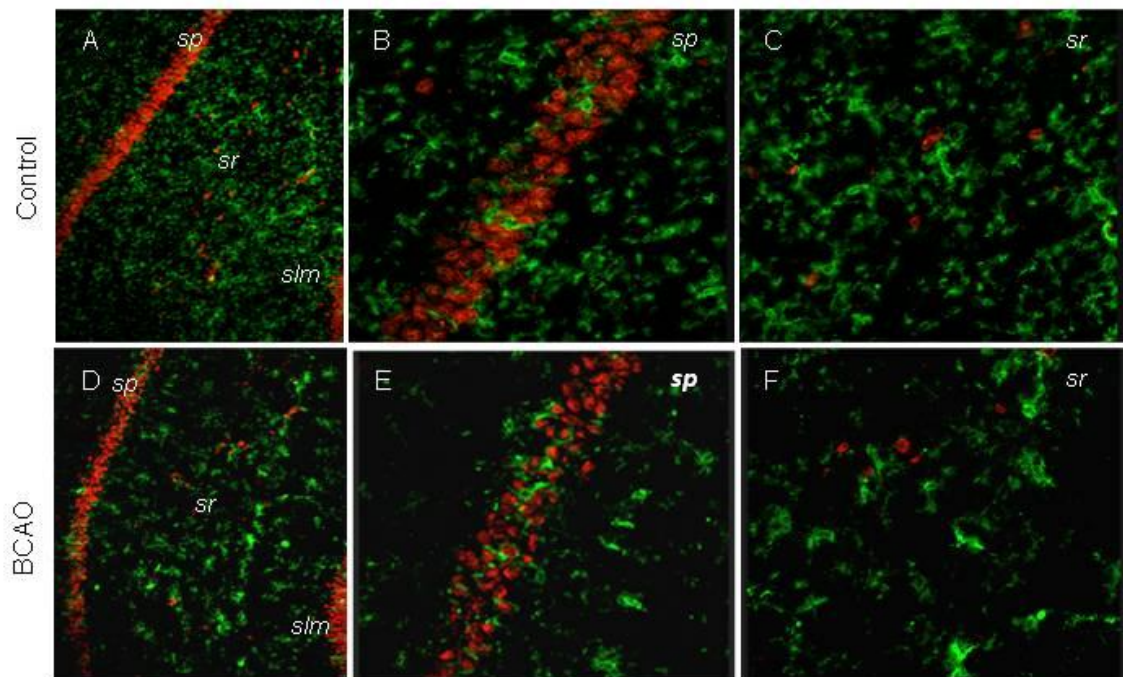


Figure 4

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Co-cultured macrophages prevent hypoxia-induced neuronal cell death in vitro

A-F: NeuN staining was performed on control organotypic hippocampal cultures (control OHC), OHC submitted to oxygen-glucose deprivation (OGD) (hypoxia) or OHC submitted to OGD and co-cultured with macrophages (hypoxia + macrophages). Low magnification views of hippocampal slices are shown in A, C and E. High magnification views of the dentate gyrus are shown in B, D and F. As compared to control hippocampal slices (A, B), neuronal cell loss was demonstrated in oxygen/glucose-deprived OHC (C, D) and was found to constantly affect the dentate gyrus. In contrast, oxygen/glucose-deprived OHC that were co-cultured with macrophages appeared partially protected from OGD-induced neuronal cell death. **G:** A quantitative analysis of neuronal density was performed in the dentate gyrus by assessing the surface covered by NeuN staining relative to the surface analyzed. An arbitrary value of 100% was given to the measures obtained in control OHC. Data show that a mean 34.8 ± 8 % neuronal density relative to controls is observed in oxygen/glucose-deprived OHC (hypoxia) and that co-cultures with macrophages (hypoxia + macrophages) allow neuronal density to reach 69.4 ± 10 % relative to controls (***: $p < 0.001$, Student's *t* test).

Figure 2: Hypoxic hippocampal slices trigger an M2 activation program in macrophages

Bone marrow-derived macrophages were cultured in the presence of control organotypic hippocampal slices (Hyp-) or oxygen/glucose-deprived OHC (Hyp+) in 6-wells culture plates. Macrophages from each experimental condition were pooled and assessed by Q-RTPCR for the expression of the following genes: inducible nitric oxide synthase (iNOS), IL-6, TNF- α and Arginase-1. As controls, analyses were performed in parallel on mRNAs extracted from

M1 macrophages (stimulated with IFN- γ), M2 macrophages (stimulated with IL-4) or M0 macrophages (unstimulated). Data show that, as expected, iNOS and the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α are highly expressed in M1 macrophages as compared to M0 or M2 macrophages. With regard to these M1-type pro-inflammatory genes, bone marrow-derived macrophages co-cultured with oxygen/glucose-deprived hippocampal slices (Hyp +) exhibit low levels of mRNA expression and a similar profile than bone marrow-derived macrophages co-cultured with control OHC (Hyp-). In contrast, the M2-type gene Arginase-1 is highly expressed in Hyp+ macrophages (co-cultured with oxygen/glucose-deprived OHC) as compared to Hyp- macrophages (co-cultured with control OHC). As expected, Arginase-1 is also highly expressed in M2 macrophages as compared to M0 or M1 macrophages. Data shown are representative of 2 independent experiments.

Figure 3: In vitro, hypoxia depletes microglia in hippocampus

A-B: An immunohistological analysis of CD11b⁺ microglia was performed on control organotypic hippocampal cultures (OHC) (control) and OHC submitted to oxygen/glucose deprivation (hypoxia). An overall decreased density of microglial cells was observed in oxygen/glucose-deprived (B) as compared to controls (A) (data representative of 3 experiments). **C-E:** A flow cytometry analysis was performed in order to quantitatively assess the percentages of CD11b⁺ microglial cells in hippocampal slices. Representative dot plots obtained from control OHC (C) or OHC submitted to oxygen/glucose deprivation (D) are shown. Results from 4 independent experiments showed that percentages of CD11b⁺ microglia readily decreased in OHC submitted to OGD as compared to controls (9.6 ± 1.6 versus 13.8 ± 1.2 , $p < 0.05$, Wilcoxon test). (*: $p < 0.05$, Wilcoxon test)

Figure 4 : In vivo, global cerebral ischemia depletes both neurons and microglia in hippocampus

Immunohistofluorescence analysis of NeuN⁺ neurons (red) and CD11b⁺ microglia (green) was performed on sham-operated mice (control, n = 5, A-C) or mice submitted to global cerebral ischemia (BCAO, n = 9, D-F), on day 1 following operations. **A-D**: low magnification views of the hippocampus in control (A) or BCAO (C) mice show an overall decrease of microglial density in BCAO mice; sp: stratum pyramidale, sr: stratum radiatum. **B-E**: High magnification views of the hippocampus in control (B) or BCAO mice (E) show that microglial density appears unchanged or slightly increased in the stratum pyramidale of BCAO mice. **C-F**: High magnification views of the hippocampus in control (C) or BCAO mice (F) show that microglial density is dramatically decreased in the stratum radiatum of ischemic mice (BCAO). **G-H**: A quantitative analysis of neuronal and microglial densities was performed in the hippocampus of BCAO (n=9) or sham-operated (n=5) mice. The surface covered by NeuN or CD11b staining relative to the surface analyzed was assessed in different areas of CA1. **G**: Data show that neuronal density is decreased in the stratum pyramidale (sp) in BCAO mice (in white) as compared to shams (0.187 ± 0.08 versus 0.47 ± 0.06 , $p < 0.001$, Student's *t* test). **H**: In the stratum pyramidale of CA1, microglial density does not significantly differ between BCAO (in white) and control mice (in black) (NS: not significant, Student's *t* test). Microglial density was strikingly decreased in the stratum radiatum (sr) of BCAO mice as compared to shams (0.12 ± 0.02 vs 0.03 ± 0.02 , $p < 0.001$, Student's *t* test). Microglial density was overall significantly decreased in the hippocampal CA1 (stratum pyramidale and stratum radiatum) of BCAO mice as compared to controls (0.12 ± 0.02 versus 0.04 ± 0.02 , $p < 0.001$). ***: $p < 0.001$, Student's *t* test.

DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse apporte un éclairage nouveau sur différents aspects de la réaction neuro-inflammatoire post-ischémique précoce et sur ses méthodes d'étude in vivo. Il s'inscrit essentiellement dans le cadre de 3 problématiques :

I) Interêts et limites de l'imagerie par RM avec USPIO dans l'étude de la réaction phagocytaire aux stades précoces post-ischémiques.

II) Effet de l'hypoxie sur les neurones et les cellules microgliales

III) Rôle des interactions précoces entre le tissu cérébral ischémié et les phagocytes sanguins

I) Limites et perspectives de l'imagerie par RM avec USPIO dans l'étude de la réaction phagocytaire aux stades aigus post-ischémiques.

L'IRM en phase aigüe de l'accident ischémique cérébral ne correspond plus à une simple exploration morphologique du parenchyme cérébral. Le développement de nouveaux outils d'IRM cellulaire et moléculaire doit permettre d'appréhender les mécanismes biologiques propres à la situation d'ischémie et d'adapter les stratégies de prise en charge de l'accident ischémique, au-delà des moyens destinés à la correction des désordres hémodynamiques. La réaction inflammatoire post-ischémique est naturellement une des cibles privilégiées de ces nouvelles approches IRM. C'est dans cette perspective que ce travail de thèse s'est intéressé à l'activation phagocytaire aux stades précoces post-ischémie et à la validation d'une technique d'IRM avec produit de contraste (USPIO) ciblant les cellules phagocytaires.

Ce travail s'inscrit dans les suites d'une étude antérieure de notre équipe (Wuart et al., 2007). A notre connaissance, cette dernière a été la première à étudier par IRM avec USPIO la réaction phagocytaire aux stades subaigus post-ischémiques dans un modèle d'AVC chez la souris. L'interprétation des signaux IRM visibles aux stades aigus post-ischémie était restée hypothétique et nécessitait l'élucidation des mécanismes d'entrée du produit de contraste dans le parenchyme cérébral.

1) Les signaux USPIO aux temps précoces post-ischémie ne reflètent pas la réaction macrophagique infiltrante ni la microglie activée.

Notre étude nous permet de suggérer que, dans ce modèle d'ischémie par pMCAO chez la souris, les modifications de signal précoces après injection d'USPIO reflèteraient principalement des mécanismes non spécifiques d'entrée des particules au cours des 24 premières heures post-ischémie. Le mode d'entrée précoce des particules semble être essentiellement une diffusion passive à la faveur d'une altération de la BHE ou une capture intravasculaire. L'hypothèse de l'infiltration par des macrophages périphériques marqués peut être écartée à ce stade : d'une part nous n'avons pas retrouvé de macrophages en périphérie de la lésion, d'autre part l'infiltration des phagocytes sanguins, dont la cinétique a été établie pour ce modèle grâce à l'utilisation de souris chimériques, est plus tardive (Tanaka et al., 2003). Le *pattern* précoce de distribution histologique du Fer contraste donc avec celui observé plus tardivement, puisqu'au-delà de 48-72 heures post-ischémie, le Fer est clairement intra-phagocytaires (Wiart et al., 2007). Ces variations spatio-temporelles incitent à tenir compte de la fenêtre temporelle par rapport à l'ischémie et à l'injection des particules pour interpréter les signaux RM en terme de localisation du produit de contraste. Ces difficultés d'interprétation pourraient rendre compte également de l'hétérogénéité des résultats obtenus dans les essais cliniques qui se sont focalisés sur les prises de contraste précoces après AVC (Cho et al., 2007b; Saleh et al., 2007). Cette hétérogénéité a été interprétée comme traduisant la variabilité interindividuelle de la réaction phagocytaire post-ischémique. Elle pourrait également, au moins en partie, refléter la variabilité des mécanismes non spécifiques de passage du produit de contraste dans le tissu ischémié.

2) Prise en compte de mécanismes non spécifiques de passage des USPIO

La mise en évidence d'une entrée non spécifique des particules dans le parenchyme cérébral ischémié pourrait aussi amener à remettre en cause l'interprétation des images tardives, jusqu'alors supposées refléter principalement l'infiltration macrophagique tardive. En effet, une prise en charge locale des particules ayant librement diffusé par les macrophages résidents doit être évoquée. Pour affirmer cette phagocytose locale, il faudrait mettre en évidence le passage de particules extracellulaires à des particules intracellulaires. Une telle démonstration nécessite de pouvoir discriminer de façon non ambiguë les USPIOs

intracellulaires des USPIOs interstitiels. Or la détection des particules de fer interstitielles par la technique standard de coloration de Perls est certainement imparfaite (Rausch et al., 2002; Stroh et al., 2006). Nous n'avons pu mettre en évidence d'USPIOs libres dans le corps calleux où nous observons précocément un hypersignal T1 uniquement chez les souris injectées avec les USPIOs. A haut champ, cet hypersignal évoque la présence de particules de fer libres, interagissant avec les protons des molécules d'eau avoisinantes au sein des fibres oedémateuses du corps calleux. L'évolution progressive de l'hypersignal T1 en hyposignal sur une séquence en écho de gradient suggère une prise en charge intracellulaire des particules puisque l'internalisation des particules est supposée entraîner une diminution des interactions protoniques (baisse de l'effet T1) et une compartimentalisation des particules à l'origine d'une majoration de l'effet de susceptibilité magnétique (majoration de l'effet T2*). Les données histologiques sont cohérentes avec cette hypothèse puisqu'elles objectivent un marquage au bleu de Perls de cellules phagocytaires dans cette localisation à 72 heures post-ischémie (Wiart et al., 2007).

3) Développement de méthodes IRM de détection des USPIO intraphagocytaires

Ces constatations in vivo et les difficultés d'interprétation des signaux IRM liés aux USPIOs ont motivé des investigations complémentaires qui ont fait l'objet d'un travail collaboratif ((Brisset et al., 2009), en Annexe). Cette étude méthodologique, en grande partie réalisée in vitro sur des fantômes d'agarose imagés à 4,7T et 7T, avait comme objectif la différenciation par IRM des particules libres versus internalisées et la quantification des relaxivités T1, T2 et T2* des macrophages issus de cultures primaires de moelle osseuse, marqués avec le Ferumoxtran-10 (Sinerem®, Guerbet, Aulnay-sous-bois, France). Il existe une diminution modérée de la relaxivité T2 des USPIO libres entre 4,7 et 7T, alors que la relaxivité T1 est fortement diminuée à 7T. Aux deux champs, l'internalisation des USPIO entraîne une diminution des effets T1 et T2 des particules de fer, comme cela avait été précédemment rapporté aux champs cliniques (Simon et al., 2006), et une augmentation marquée des effets T2*. Cette diminution est plus importante à 7T qu'à 4,7T. En particulier, l'effet T1 des macrophages marqués est aboli à 7T. Parallèlement, des séquences spécifiques permettant la détection des particules intracellulaires versus libres sont en cours d'évaluation par notre équipe. Cette détection est basée sur l'exploitation des artéfacts des distorsions de champ magnétique obtenues pour des objets entraînant un fort gradient de susceptibilité magnétique, typiquement les macrophages marqués avec les USPIOs (Brisset et al., en préparation).

4) Détection précoce des "autres phagocytes mononucléés résidents du SNC "

Au cours de ce travail expérimental aux stades aigus post-ischémie, nous avons montré que quelques cellules macrophagiques phagocytèrent précocement les particules. Ces macrophages particuliers (méningés, périvasculaires et associés aux plexus choroïdes 2^{ème} partie § II) 1) b)) sont caractérisés par leur proximité avec le LCR, qui apparaît dès lors comme une voie de diffusion potentielle des USPIO dans le parenchyme cérébral suite à une ischémie. Récemment, une autre étude a élégamment confirmé le rôle particulier joué au cours de la réaction inflammatoire post-ischémique de ces macrophages résidents du SNC stratégiquement localisés aux interfaces LCR/sang/cerveau (Henning et al., 2009). Cette étude réalisée chez le Rat dans un modèle de tMCAO nous apparaît particulièrement pertinente car la mise en évidence de la prise en charge du produit de contraste IRM (SPIO) par ces macrophages a été couplée à leur phénotypage. En effet, ces macrophages résidents du SNC sont identifiés au cours de la réaction inflammatoire post-ischémique par leur phénotype ED-2+/TNF α + /CMHII+. Il s'agit d'une sous-population du système des phagocytes mononucléés dont le rôle au cours de la réaction neuro-inflammatoire post-ischémique a été peu étudié et très probablement sous-estimé. Ces macrophages sont en effet clairement activés très précocement en post-ischémie et impliqués dans la présentation d'antigènes (CMHII+) et donc l'activation lymphocytaire, ainsi que la production cytokinique (TNF α +). Ces cellules immunocompétentes résidentes, situées de façon privilégiée à l'interface du milieu interstitiel cérébral, du LCR et du sang périphérique, sont idéalement placées pour participer aux échanges entre le SNC et le système immunitaire. Un rôle central de cette population particulière des macrophages résidents du SNC a ainsi été clairement mis en évidence dans d'autres pathologies neuroinflammatoires comme la sclérose en plaque et ses modèles expérimentaux d'encéphalites allergiques expérimentales (EAE) (Lassmann et al., 1991) (Polfliet et al., 2002). La mise en évidence d'une détection par IRM avec particules de fer de l'activation précoce de ces sous-populations phagocytaires cérébrales ouvre des perspectives intéressantes d'étude non-invasive de leurs rôles au cours de la réaction inflammatoire post-ischémique.

De manière plus générale, les interactions au cours de la réaction inflammatoire post-ischémique entre les cellules cérébrales et le système immunitaire représenté par les phagocytes mononucléés ont fait l'objet de la 2^{ème} étude de ce travail de thèse.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés au versant central de ces échanges en évaluant l'impact de l'hypoxie sur les cellules résidentes du parenchyme cérébral puisque cette atteinte conditionne la réaction phagocytaire

II) Effet de l'hypoxie sur les neurones et les cellules microgliales

1) Au sein du tissu ischémié, les cellules microgliales souffrent elles-aussi ...

De façon intéressante, les interactions précoces et complexes entre les cellules du tissu cérébral ischémié et les phagocytes dérivés du système immunitaire périphérique perturbent probablement l'appréciation de la susceptibilité des cellules microgliales à l'ischémie. En effet, il reste difficile de distinguer par leur phénotype (même moléculaire) le macrophage infiltrant de la cellule microgliale. Or sur le plan chronologique, l'infiltration des macrophages dérivés du sang est précoce (dès 24 heures post-ischémie) et massive, comme l'ont montré les études utilisant des souris chimériques (Tanaka et al., 2003). Par ailleurs, une étude récente a montré *in vitro* que les macrophages infiltrants étaient capables de s'adapter aux conditions d'anaérobies (Roiniotis et al., 2009). Cette potentielle confusion entre macrophages infiltrants et microglie résidente pourrait expliquer que la plupart des études expérimentales ont mis en évidence une préservation voire une augmentation précoce de la densité de la microglie résidente en post-hypoxie (cf 2^{ème} partie §II) 2) b)). C'est notamment le cas d'études très récentes utilisant des techniques complémentaires de cytométrie de flux ou de biologie moléculaire (western blot associé à une analyse par PCR quantitative) pour analyser la dynamique inflammatoire post-ischémique (Lambertsen et al., 2007) (Gelderblom et al., 2009).

En fait, une souffrance microgliale post-ischémique a déjà été mise en évidence par quelques travaux ultérieurs (2^{ème} partie §II) 2) b) ε), y compris chez l'Homme dans une série autopsique (Love et al., 2000). Nous avons également observé une diminution de la densité microgliale en condition hypoxique sévère, à la fois *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, le modèle d'hypoxie sur tranche tissulaire offre justement l'avantage d'écarter toute possibilité d'infiltration macrophagique périphérique. Par ailleurs, l'analyse quantitative de la microglie ischémiée par cytométrie de flux n'avait, à notre connaissance, jamais été réalisée sur des cultures organotypiques. Cette méthode de comptage nous est apparue plus fiable que les techniques d'analyse d'image, étant donnée la densité élevée de cellules microgliales dans les tranches organotypiques. *In vivo*, nous avons également observé une perte microgliale au sein des

hippocampes sévèrement ischémiés. Pour interpréter ces observations *in vivo*, apparemment contradictoires, on peut évoquer naturellement une variabilité de la souffrance microgliale en fonction de la sévérité des conditions ischémiques. Comme les quelques études ayant mis en évidence une perte microgliale, notre étude a été réalisée dans un modèle d'hypoxie globale et très sévères (dans 50% des cas léthales). Au contraire, les augmentations post-ischémiques de la densité microgliale ont été notées dans des modèles d'ischémie locale et/ou peu sévères (Olson and McKeon, 2004; Skibo et al., 2000). Il a ainsi été montré dans un modèle d'ischémie focale chez la souris que l'accumulation microgliale était non seulement hétérogène au sein de l'hémisphère ischémié mais surtout variable en fonction de la durée de l'ischémie et donc de sa sévérité (Denes et al., 2007). Au sein des lésions ischémiques focales très sévères, ces auteurs ont eux aussi constaté une baisse précoce de la densité microgliale.

2) Cette souffrance microgliale est hétérogène au sein du tissu ischémié

L'hétérogénéité de la densité microgliale au sein des zones ischémiées est probablement un autre facteur à prendre en compte pour expliquer ces données apparemment contradictoires. Nous avons montré qu'au sein de la corne d'Ammon hippocampique (CA1), la perte neuronale dans la couche pyramidale était associée à une perte microgliale globale, particulièrement marquée dans les couches radiaire et lacunaire. Cette atteinte microgliale hippocampique, parallèle à la souffrance neuronale, n'est pas vérifiée au sein même de la couche pyramidale, par constitution très " neuronale ". Cette hétérogénéité au sein d'une même structure tissulaire peut expliquer que Sugawara et al. aient conclu à une relative indépendance entre la souffrance microgliale et la perte neuronale (Sugawara et al., 2002). En effet, dans leur étude, également réalisée dans un modèle d'ischémie transitoire globale transitoire, ces auteurs se sont exclusivement intéressés à la souffrance cellulaire dans la couche pyramidale, qui ne reflète pas forcément l'ensemble de la structure, comme nos résultats le suggèrent.

Cette hétérogénéité de la densité microgliale fait par ailleurs évoquer la possibilité de phénomènes migratoires. La cellule microgliale est notoirement dotée de capacités de motilité de ses prolongements cellulaires et de migration. Ces phénomènes dynamiques, observés au cours du développement, ont été mis en évidence par des études d'imagerie *in vivo* dans des conditions neuro-inflammatoires (Davalos et al., 2005) (Nimmerjahn et al., 2005) (Simard et al., 2006). On peut donc interpréter l'apparente augmentation post-hypoxique de la densité microgliale observée dans plusieurs études comme résultant, au moins en partie, d'une

migration de cellules microgliales en provenance de zone préservées. La perte microgliale que nous avons observée peut également, a contrario, être interprétée comme secondaire à un désertement des zones atteintes au profit de région préservée, pénombrales. Seules des études d'imagerie moléculaire in vivo, en temps réel, par technique bio-luminescente ou bio-photonique pourraient élucider cette redistribution cellulaire associée à cette souffrance hypoxique. Actuellement, à notre connaissance, la faiblesse principale de ces techniques de bio-imagerie, très sensible et à haute résolution, reste leur faible pénétration tissulaire limitant l'exploration au cortex chez la souris (voir pour revue (Kriz and Lalancette-Hebert, 2009)).

Le développement de ces nouvelles techniques d'imagerie in vivo est cependant en plein essor et pourrait éclairer les interactions entre neurones et microglie en phase précoce post-ischémie.

3) Des interactions privilégiées entre neurones et microglies en phase précoce post-ischémique.

Nos résultats sont en faveur d'une préservation des contacts entre neurones ischémiés et microglies au sein de la couche pyramidale du CA1, contrastant avec une perte microgliale globale au sein du CA1. Une autre étude, dans un modèle d'ischémie globale chez le rat, avait montré une activation microgliale très localisée à la couche pyramidale du CA1 (Stephenson et al., 1995). Ces observations rappellent l'étude en imagerie bi-photonique de Wake et al., qui met en évidence des modifications des contacts entre prolongements microgliaux et synapses après ischémie focale chez la souris (Wake et al., 2009). Ces auteurs suggèrent que les cellules microgliales participeraient ainsi activement à l'élimination des connections synaptiques au cours de l'ischémie cérébrale, sous-tendant des processus de neuroplasticité. De telles observations ouvrent bien entendu la porte à tout un champ d'investigations explorant les relations entre neuro-inflammation et neuroplasticité. La plupart des études qui se sont intéressées à ces interactions entre inflammation, perte neuronale/neurogénèse et neuroplasticité, ont ciblé leur travail sur le rôle des différentes cytokines pro-inflammatoires et facteurs neurotrophiques (Di Filippo et al., 2008). Le rôle éventuel sur la réparation neuronale des cellules immunes a été peu étudié. La nature "moléculaire" des échanges entre neurones ischémiés et microglie reste notamment à élucider. Les neurones ischémiés ne sont certainement pas "passifs" dans ces échanges et participent certainement au recrutement des cellules microgliales. Wang et al. ont ainsi montré que la production neuronale de radicaux libres induisait la production de chimiokine MIP- α , impliquée dans le chimiotactisme phagocytaire (Wang et al., 2008). Notre approche expérimentale in vitro d'hypoxie sur

tranches organotypiques apparaît également pertinente dans cette perspective d'élucidation des dialogues entre neurones et microglies ischémiés. Nous avons mis au point une analyse par cytométrie de flux sur cultures tissulaires qui offre des possibilités de tri cellulaire (notamment des cellules microgliales) et d'analyse des profils transcriptomiques. Cette méthode expérimentale devrait nous permettre d'appréhender les interactions potentielles entre la souffrance tissulaire cérébrale et la réaction inflammatoire périphérique. A notre connaissance, une seule étude a établi un lien direct entre la souffrance microgliale hippocampique se traduisant par l'expression de la caspase-1 et la mise en jeu de phénomènes inflammatoires dans un modèle d'hypoxie globale chez la Gerbille (Bhat et al., 1996). La caspase-1 exprimée par la microglie ischémiée au sein de la couche CA1, à proximité des neurones pyramidaux, n'est autre que l'enzyme de conversion de l'IL-1 β , cytokine pro-inflammatoire notoire (cf I 3. a)).

Dans ce cadre des échanges potentiels entre tissu cérébral ischémié et système immunitaire, nous avons choisi de modéliser et d'étudier les interactions précoces entre phagocytes circulants et tissu hippocampique hypoxié.

III) Le rôle des interactions précoces entre le tissu cérébral ischémié et les phagocytes sanguins

1) Les macrophages infiltrant exerceraient un rôle neuroprotecteur par médiation humorale

L'objectif de notre 2^{ème} étude était d'analyser les effets de co-cultures macrophagiques sur la survie neuronale. Nous avons mis en évidence un effet neuroprotecteur, à médiation humorale de macrophages dérivés de la moelle osseuse exposés à un tissu cérébral ischémié. Une publication antérieure avait montré que des cellules microgliales placées en contact direct avec des tranches hypoxiées avaient également un effet neuroprotecteur (Neumann et al., 2006). Nos conditions expérimentales présentent deux différences majeures avec cette étude-référence. D'une part, nous étudions les effets de cultures primaires de macrophages et non d'une lignée tumorale microgliale. D'autre part, ces cultures macrophagiques n'ont pas de contact direct avec le tissu nerveux ischémié. L'absence de contact direct avec les cellules nerveuses permet d'étudier spécifiquement les effets liés à la sécrétion de molécules solubles. En effet, s'il existe des données concernant la cinétique d'infiltration des macrophages (cf II)

2) b) β)), seules quelques études se sont intéressées au profil fonctionnel de ces macrophages infiltrants et à leur rôle spécifique dans la physiopathologie des lésions ischémiques (Gregersen et al., 2000; Lees, 1993) (Hughes et al., 2002) (Lehrmann et al., 1998). Ces études ont conduit à des conclusions souvent contradictoires, en sachant qu'elles ont rencontré les difficultés habituelles liées à la distinction des populations phagocytaires (macrophages infiltrant versus microglie). Gregersen et al. ont ainsi montré que les macrophages étaient la principale source de TNF, cytokine pro-inflammatoire (Gregersen et al., 2000). Egalement en faveur d'un profil pro-inflammatoire délétère, l'absence d'expression de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), chimiokine responsable du recrutement macrophagique, entraîne une diminution de la taille de la lésion ischémique (Hughes et al. 2002). En revanche, Lees et al. ont rapporté que les macrophages pourraient au contraire retarder la mort neuronale par production de facteurs de croissance (Lees, 1993). De même, il a été montré que les macrophages étaient la principale source de TGF- β (Transforming Growth Factor), cytokine neurotrophique (Lehrmann et al., 1998). Nos résultats permettent de porter un nouvel éclairage sur ces publications en suggérant que les macrophages, ou tout au moins certaines populations macrophagiques, pourraient avoir un effet neuroprotecteur via la synthèse de facteurs solubles.

2) Un effet neuroprotecteur lié à une activation macrophagique de type M2

En étudiant les interactions moléculaires entre macrophages co-cultivés et tranches hypoxiées, nous avons observé une activation macrophagique de type M2, caractérisée notamment par la surexpression d'arginase-1 (molécule inhibant l'activité de la iNOS (Durante et al., 2007; Edwards et al., 2006)). Ce résultat suggère que l'effet observé sur la survie neuronale est en rapport avec la synthèse macrophagique de facteurs potentiellement neuro-protecteurs et qui accompagne l'activation de type M2. Nous n'avons pas clairement identifié les molécules neuroprotectrices synthétisées par les macrophages dans notre système d'étude. Parmi les molécules candidates figurent l'IGF-1 et le TGF- β , deux molécules synthétisées par les macrophages M2 (Mantovani et al., 2004). Pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu déterminer l'expression d'IGF-1 par RT-PCR. Cette analyse reste à réaliser, d'autant plus qu'il a été récemment montré que l'IGF-1 administrée à la phase aigüe d'un AVC expérimental chez la souris exerçait un effet neuroprotecteur majeur (Kooijman et al., 2009). Nous avons pu analyser l'expression macrophagique de TGF- β au niveau de l'ARNm. Nos résultats préliminaires sont en faveur d'une expression accrue de TGF- β lorsque les macrophages sont co-cultivés avec les tranches hypoxiées. Dans des modèles murins

d'ischémie cérébrale, l'administration de TGF- β prévient la mort neuronale par apoptose (Zhu et al., 2002). Au contraire, l'administration d'un antagoniste du TGF- β induit une aggravation des lésions neuronales (Ruocco et al., 1999). Nos résultats concordent ainsi avec ces données de la littérature.

De façon intéressante, une étude récente a montré que dans un modèle murin d'AVC ischémique, les macrophages infiltrants formaient une population fonctionnellement hétérogène au regard de leur profil d'expression cytokinique (Clausen et al., 2008). Ces différentes sous-populations macrophagiques pourraient exercer des effets opposés ou synergiques sur le devenir de l'atteinte neuronale en fonction de leur profil.

Par ailleurs, il faut également considérer le rôle potentiel des macrophages non-infiltrants, notamment ceux localisés dans les organes lymphoïdes (rate, moelle osseuse, ganglions) et qui pourraient participer à la réponse immune systémique observée dans l'AVC ischémique (Offner et al., 2006a; Offner et al., 2006b). Ces macrophages résidents des organes lymphoïdes sont susceptibles de moduler à distance le devenir des cellules neuronales, comme observé dans notre modèle d'étude via la sécrétion de cytokines neuroprotectrices pouvant agir sur le mode endocrine,

3) Stabilité et spécificité du profil neuroprotecteur des macrophages périphériques ?

Afin de confirmer l'hypothèse d'un rôle neuroprotecteur des macrophages M2, il sera également intéressant d'étudier les effets de macrophages M1 sur la survie neuronale dans notre système d'étude. Ce type d'expérience permettrait également d'étudier la stabilité du phénotype M1 dans nos conditions expérimentales. Il est en effet probable que le profil cytokinique des macrophages activés (M1 ou M2) ne soit pas figé et qu'il puisse être modulé par leur micro-environnement cytokinique et leur activité phagocytaire. La réalité de ce phénomène a été mis en évidence dans un modèle d'inflammation musculaire (Arnold et al., 2007).

Enfin, il reste à démontrer le caractère macrophage-spécifique des effets neuroprotecteurs observés dans notre système de co-culture. Lors d'expériences préliminaires, nous avons également testé l'effet de co-cultures de microglie et de lymphocytes. Ces résultats restent à confirmer mais indiquent clairement que la microglie semble avoir un effet neuroprotecteur, au même titre que les macrophages alors que les lymphocytes T sont sans effets.

4) Déterminisme de cette activation de type M2 ?

Nos résultats montrent que les tranches hypoxiées synthétisent des facteurs solubles induisant un profil macrophagique M2. Nos premiers résultats suggèrent que l'IL-10 pourrait être l'une de ces molécules. Les résultats obtenus dans ce travail devront être approfondis à plusieurs niveaux. Une meilleure caractérisation des échanges moléculaires entre tranches hypoxiées et macrophages est nécessaire. Si une synthèse d'IL-10 par les tranches hypoxiées est confirmée, son rôle probable dans l'induction d'un programme macrophagique neuroprotecteur pourra être suggéré. Cette cytokine pourrait alors être utilisée comme marqueur périphérique pronostic et/ou comme agent thérapeutique dans l'AVC ischémique. En faveur de cette hypothèse, une étude clinique récente a montré que l'élévation du taux sérique d'IL-10 était corrélée à une évolution favorable de l'AVC ischémique chez les patients (Nayak et al., 2009). L'expression d'IL-10 des monocytes sanguins de patients présentant un AVC est augmentée par rapport aux témoins (Pelidou et al., 1999). Au contraire, les patients ayant un taux d'IL-10 faible verraient leur risque de présenter un AVC augmenter (Emsley and Tyrrell, 2002). Par ailleurs, cette augmentation du taux sérique d'IL-10 apparaît comme un facteur prédictif indépendant du risque infectieux immédiat post-AVC (Chamorro et al., 2006). Cette corrélation traduit un rôle anti-inflammatoire et donc potentiellement immuno-suppresseur. Récemment, dans un modèle murin d'AVC ischémique, il a été démontré que l'IL-10 synthétisée par une sous-population de lymphocytes T (les lymphocytes T régulateurs) prévenait l'extension des lésions ischémiques (Liesz et al., 2009). Nous prévoyons d'identifier le type cellulaire synthétisant l'IL-10 dans les tranches hypoxiées en réalisant des expériences d'hybridation *in situ* et/ou d'immunohistologie sur coupes de cultures organotypiques. Par ailleurs, nous analyserons plus spécifiquement l'expression microgiale d'IL-10 dans les tranches hypoxiées en utilisant un appareil FACS/trieur pour isoler les cellules CD11b+ et étudier leur profil d'expression par RT-PCR. Cette approche pourrait nous permettre d'élucider le dialogue cytokinique qui vraisemblablement s'établit précocément au sein du tissu cérébral ischémié entre les 2 contingents de cellules immunocompétentes dérivées de la lignée myéloïde.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Nous n'avons pas résolu la question fatidique du rôle bénéfique ou délétère de la réaction phagocytaire post-ischémique. Tenter de répondre à cette question de manière tranchée est certainement vain. En effet, il est très probable que les différents acteurs phagocytaires de la réaction post-ischémique exercent des rôles duels et variables en fonction de la fenêtre temporelle. Les approches expérimentales auront certainement du mal à s'affranchir des biais liés au mode d'activation de ces cellules qui sont vraisemblablement capables de changer de profil (inflammatoires ou neuroprotecteur) en fonction leur microenvironnement. Cette versatilité des potentielles cibles thérapeutiques expliquent certainement l'échec actuel de la plupart des essais cliniques. Il est délicat de construire un design d'étude clinique tenant compte de ces rôles ambivalents et versatiles. Or cette réaction phagocytaire est au centre des interactions entre le système immunitaire et le SNC ischémié et conditionne donc indiscutablement le décours des lésions ischémiques.

Dans ce contexte, notre travail nous semble contributif sur 2 aspects :

Le design de futurs essais thérapeutiques ciblant la réponse inflammatoire post-ischémique exige une évaluation fiable de la réaction phagocytaire. L'IRM avec produit de contraste cellulaire est une approche extrêmement prometteuse. Nous avons par ce travail souligné l'importance de la prise en compte de la fenêtre temporelle pour l'interprétation des signaux USPIO en terme de distribution histologique du produit de contraste supposé phagocytaire. Nous avons mis en évidence des " failles " dans la méthodologie USPIO qui a motivé le développement de nouvelles séquences et méthodes de quantification, améliorant la détection des cellules macrophagiques in vivo au sein du SNC lésé.

Nous avons mis en évidence un effet neuroprotecteur, à médiation humorale de macrophages dérivés de la moelle osseuse exposés à un tissu cérébral ischémié. Une meilleure caractérisation de ces échanges moléculaires est nécessaire. L'identification des molécules neuroprotectrices synthétisées par les macrophages dans notre modèle d'étude in vitro est en cours. En amont, il paraît également prometteur d'identifier les molécules sécrétées par le tissu ischémié, ainsi que les populations cellulaires sécrétrices. En effet, certaines de ces molécules ont spécifiquement la capacité d'induire une activation macrophagique

neuroprotectrice dans des conditions ischémiques. L'IL-10 est notre première cytokine candidate au potentiel intérêt thérapeutique, que nous souhaiterions tester prochainement dans notre modèle *in vivo* d'ischémie cérébrale globale.

BIBLIOGRAPHIE

- The European Registers of stroke investigators. Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SL, Persson MA. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 15983-8.
- Abraham H, Somogyvari-Vigh A, Maderdrut JL, Vigh S, Arimura A. Filament size influences temperature changes and brain damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Exp Brain Res* 2002; 142: 131-8.
- Abumiya T, Lucero J, Heo JH, Tagaya M, Koziol JA, Copeland BR, et al. Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin alpha(v)beta3 during focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 1038-50.
- 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: 1739-43.
- Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 734-44.
- Allan SM, Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358: 1669-77.
- Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia* 2001; 36: 165-79.
- Aloisi F, Serafini B, Adorini L. Glia-T cell dialogue. *J Neuroimmunol* 2000; 107: 111-7.
- Andjelkovic AV, Nikolic B, Pachter JS, Zecevic N. Macrophages/microglial cells in human central nervous system during development: an immunohistochemical study. *Brain Res* 1998; 814: 13-25.
- Arai H, Furuya T, Yasuda T, Miura M, Mizuno Y, Mochizuki H. Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1beta, and expression of caspase-11 in mice. *J Biol Chem* 2004; 279: 51647-53.
- Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Bulte JW, Frank JA. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques. *Transplantation* 2003a; 76: 1123-30.
- Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, et al. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology* 2003b; 229: 838-46.
- Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, et al. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood* 2004; 104: 1217-23.
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 2007; 204: 1057-69.
- 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: 1048-56.
- Arvin KL, Han BH, Du Y, Lin SZ, Paul SM, Holtzman DM. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* 2002; 52: 54-61.
- Asahi M, Asahi K, Wang X, Lo EH. Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 452-7.
- Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 2001; 21: 7724-32.
- Aschner JL, Lum H, Fletcher PW, Malik AB. Bradykinin- and thrombin-induced increases in endothelial permeability occur independently of phospholipase C but require protein kinase C activation. *J Cell Physiol* 1997; 173: 387-96.

- Astrup J, Siesjo BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 1981; 12: 723-5.
- Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007; 317: 666-70.
- Auffray C, Fogg DK, Narni-Mancinelli E, Senechal B, Trouillet C, Saederup N, et al. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 2009a; 206: 595-606.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009b; 27: 669-92.
- Baird AE, Benfield A, Schlaug G, Siewert B, Lovblad KO, Edelman RR, et al. Enlargement of human cerebral ischemic lesion volumes measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 1997; 41: 581-9.
- Baird AE, Warach S. Magnetic resonance imaging of acute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 583-609.
- Bardutzky J, Shen Q, Henninger N, Bouley J, Duong TQ, Fisher M. Differences in ischemic lesion evolution in different rat strains using diffusion and perfusion imaging. *Stroke* 2005; 36: 2000-5.
- Baron JC. Mapping the ischaemic penumbra with PET: a new approach. *Brain* 2001a; 124: 2-4.
- Baron JC. Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc Dis* 2001b; 11 Suppl 1: 2-8.
- Baron JC, Bousser MG, Rey A, Guillard A, Comar D, Castaigne P. Reversal of focal "misery-perfusion syndrome" by extra-intracranial arterial bypass in hemodynamic cerebral ischemia. A case study with 15O positron emission tomography. *Stroke* 1981; 12: 454-9.
- Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, et al. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997a; 28: 1233-44.
- Barone FC, Feuerstein GZ, White RF. Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection. *Neurosci Biobehav Rev* 1997b; 21: 31-44.
- Barone FC, Schmidt DB, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Feuerstein GZ, et al. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. *Stroke* 1992; 23: 1337-47; discussion 1347-8.
- Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, et al. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 1999; 19: 1708-16.
- Beamer NB, Coull BM, Clark WM, Hazel JS, Silberger JR. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. *Ann Neurol* 1995; 37: 800-5.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 1620-4.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; 17: 472-6.
- Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 1996; 739: 88-96.
- Bellin MF, Roy C, Kinkel K, Thoumas D, Zaim S, Vanel D, et al. Lymph node metastases: safety and effectiveness of MR imaging with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles--initial clinical experience. *Radiology* 1998; 207: 799-808.
- Benavides J, Quarteronet D, Imbault F, Malgouris C, Uzan A, Renault C, et al. Labelling of "peripheral-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [3H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. *J Neurochem* 1983; 41: 1744-50.
- Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, et al. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* 2001; 21: 7127-34.

- Bendel O, Alkass K, Bueters T, von Euler M, von Euler G. Reproducible loss of CA1 neurons following carotid artery occlusion combined with halothane-induced hypotension. *Brain Res* 2005; 1033: 135-42.
- Bendszus M, Kleinschnitz C, Stoll G. Iron-enhanced MRI in ischemic stroke: intravascular trapping versus cellular inflammation. *Stroke* 2007; 38: e12; author reply e13.
- 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* 2003a; 987: 32-8.
- Beray-Berthat V, Palmier B, Plotkine M, Margail I. Neutrophils do not contribute to infarction, oxidative stress, and NO synthase activity in severe brain ischemia. *Exp Neurol* 2003b; 182: 446-54.
- Berry K, Wisniewski HM, Svarzbein L, Baez S. On the relationship of brain vasculature to production of neurological deficit and morphological changes following acute unilateral common carotid artery ligation in gerbils. *J Neurol Sci* 1975; 25: 75-92.
- Bhat RV, DiRocco R, Marcy VR, Flood DG, Zhu Y, Dobrzanski P, et al. Increased expression of IL-1beta converting enzyme in hippocampus after ischemia: selective localization in microglia. *J Neurosci* 1996; 16: 4146-54.
- Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 57-69.
- Boog G. [Acute fetal distress]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2001; 30: 393-432.
- Bosco MC, Puppo M, Santangelo C, Anfosso L, Pfeffer U, Fardin P, et al. Hypoxia modifies the transcriptome of primary human monocytes: modulation of novel immune-related genes and identification of CC-chemokine ligand 20 as a new hypoxia-inducible gene. *J Immunol* 2006; 177: 1941-55.
- Brinker G, Franke C, Hoehn M, Uhlenkuken U, Hossmann KA. Thrombolysis of cerebral clot embolism in rat: effect of treatment delay. *Neuroreport* 1999; 10: 3269-72.
- Briones TL, Suh E, Jozsa L, Rogozinska M, Woods J, Wadowska M. Changes in number of synapses and mitochondria in presynaptic terminals in the dentate gyrus following cerebral ischemia and rehabilitation training. *Brain Res* 2005; 1033: 51-7.
- Brisset JC, Desestret V, Marcellino S, Devillard E, Chauveau F, Lagarde F, et al. Quantitative effects of cell internalization of two types of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles at 4.7 T and 7 T. *Eur Radiol* 2009.
- Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 2009; 111: 483-95.
- Brown CE, Wong C, Murphy TH. Rapid morphologic plasticity of peri-infarct dendritic spines after focal ischemic stroke. *Stroke* 2008; 39: 1286-91.
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, et al. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 1996; 2: 788-94.
- Brune B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998; 351: 261-72.
- Buchan AM, Xue D, Slivka A. A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat. *Stroke* 1992; 23: 273-9.
- Bulte JW, Douglas T, Witwer B, Zhang SC, Strable E, Lewis BK, et al. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1141-7.
- Bulte JW, Duncan ID, Frank JA. In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 899-907.
- Bulte JW, Frank JA. Imaging macrophage activity in the brain by using ultrasmall particles of iron oxide. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21: 1767-8.
- Bulte JW, Laughlin PG, Jordan EK, Tran VA, Vymazal J, Frank JA. Tagging of T cells with superparamagnetic iron oxide: uptake kinetics and relaxometry. *Acad Radiol* 1996; 3 Suppl 2: S301-3.

- Bulte JW, Ma LD, Magin RL, Kamman RL, Hulstaert CE, Go KG, et al. Selective MR imaging of labeled human peripheral blood mononuclear cells by liposome mediated incorporation of dextran-magnetite particles. *Magn Reson Med* 1993; 29: 32-7.
- Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Ginsberg MD. The importance of brain temperature in cerebral ischemic injury. *Stroke* 1989; 20: 1113-4.
- Bye N, Habgood MD, Callaway JK, Malakooti N, Potter A, Kossmann T, et al. Transient neuroprotection by minocycline following traumatic brain injury is associated with attenuated microglial activation but no changes in cell apoptosis or neutrophil infiltration. *Exp Neurol* 2007; 204: 220-33.
- Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2005; 2: 396-409.
- Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* 1998; 22: 72-85.
- Cha JK, Jeong MH, Lee KM, Bae HR, Lim YJ, Park KW, et al. Changes in platelet P-selectin and in plasma C-reactive protein in acute atherosclerotic ischemic stroke treated with a loading dose of clopidogrel. *J Thromb Thrombolysis* 2002; 14: 145-50.
- Chamorro A, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera A, Torres F, et al. Interleukin 10, monocytes and increased risk of early infection in ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 1279-81.
- Chamorro A, Urra X, Planas AM. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke* 2007; 38: 1097-103.
- Chen H, Chopp M, Zhang RL, Bodzin G, Chen Q, Rusche JR, et al. Anti-CD11b monoclonal antibody reduces ischemic cell damage after transient focal cerebral ischemia in rat. *Ann Neurol* 1994; 35: 458-63.
- Chen Y, Ruetzler C, Pandipati S, Spatz M, McCarron RM, Becker K, et al. Mucosal tolerance to E-selectin provides cell-mediated protection against ischemic brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 15107-12.
- Cheng FY, Su CH, Yang YS, Yeh CS, Tsai CY, Wu CL, et al. Characterization of aqueous dispersions of Fe(3)O(4) nanoparticles and their biomedical applications. *Biomaterials* 2005; 26: 729-38.
- Cho JY, Kim IS, Jang YH, Kim AR, Lee SR. Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2006; 404: 330-5.
- Cho KO, Kim SK, Cho YJ, Sung KW, Kim SY. Regional differences in the neuroprotective effect of minocycline in a mouse model of global forebrain ischemia. *Life Sci* 2007a; 80: 2030-5.
- Cho TH, Nighoghossian N, Wiart M, Desestret V, Cakmak S, Berthezene Y, et al. USPIO-enhanced MRI of neuroinflammation at the sub-acute stage of ischemic stroke: preliminary data. *Cerebrovasc Dis* 2007b; 24: 544-6.
- Chock VY, Giffard RG. Development of neonatal murine microglia in vitro: changes in response to lipopolysaccharide and ischemia-like injury. *Pediatr Res* 2005; 57: 475-80.
- Chopp M, Knight R, Tidwell CD, Helpert JA, Brown E, Welch KM. The metabolic effects of mild hypothermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: comparison to normothermia and hyperthermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9: 141-8.
- Chou WH, Choi DS, Zhang H, Mu D, McMahon T, Kharazia VN, et al. Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 49-56.
- Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett* 1997; 238: 53-6.
- 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: 387-92.
- Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Hazel K, Hill JK, Stenzel-Poore M, et al. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke* 2000; 31: 1715-20.
- Clausen BH, Lambertsen KL, Babcock AA, Holm TH, Dagnaes-Hansen F, Finsen B. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 46.

- Connolly ES, Jr., Winfree CJ, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Choudhri TF, Hoh BL, et al. Exacerbation of cerebral injury in mice that express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. *Circ Res* 1997; 81: 304-10.
- Connolly ES, Jr., Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, et al. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 1996; 97: 209-16.
- Cordeau P, Jr., Lalancette-Hebert M, Weng YC, Kriz J. Live imaging of neuroinflammation reveals sex and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury. *Stroke* 2008; 39: 935-42.
- Corot C, Petry KG, Trivedi R, Saleh A, Jonkmanns C, Le Bas JF, et al. Macrophage imaging in central nervous system and in carotid atherosclerotic plaque using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* 2004; 39: 619-25.
- Corot C, Robert P, Idee JM, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1471-504.
- Coyle P. Different susceptibilities to cerebral infarction in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive Sprague-Dawley rats. *Stroke* 1986; 17: 520-5.
- Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, Settles M, Piontek G, Metz S, et al. Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology* 2003; 228: 760-7.
- Danton GH, Dietrich WD. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 127-36.
- Darby DG, Barber PA, Gerraty RP, Desmond PM, Yang Q, Parsons M, et al. Pathophysiological topography of acute ischemia by combined diffusion-weighted and perfusion MRI. *Stroke* 1999; 30: 2043-52.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005; 8: 752-8.
- Davis M, Mendelow AD, Perry RH, Chambers IR, James OF. Experimental stroke and neuroprotection in the aging rat brain. *Stroke* 1995; 26: 1072-8.
- Davoust N, Vuailat C, Androdias G, Nataf S. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol* 2008; 29: 227-34.
- de Bilbao F, Arsenijevic D, Moll T, Garcia-Gabay I, Vallet P, Langhans W, et al. In vivo over-expression of interleukin-10 increases resistance to focal brain ischemia in mice. *J Neurochem* 2009.
- del Zoppo GJ. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 2009; 158: 972-82.
- del Zoppo GJ, Becker KJ, Hallenbeck JM. Inflammation after stroke: is it harmful? *Arch Neurol* 2001; 58: 669-72.
- del Zoppo GJ, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 879-94.
- 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: 1276-83.
- Denes A, Vidyasagar R, Feng J, Narvainen J, McColl BW, Kauppinen RA, et al. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 1941-53.
- Deplanque D. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale. *Encycl Méd Chir* 2003; Neurologie.
- Dereski MO, Chopp M, Knight RA, Rodolosi LC, Garcia JH. The heterogeneous temporal evolution of focal ischemic neuronal damage in the rat. *Acta Neuropathol* 1993; 85: 327-33.
- Desestret V, Brisset JC, Moucharrafié S, Devillard E, Nataf S, Honnorat J, et al. Early-stage investigations of ultrasmall superparamagnetic iron oxide-induced signal change after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Stroke* 2009; 40: 1834-41.
- Di Filippo M, Sarchielli P, Picconi B, Calabresi P. Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 402-12.
- Dietrich WD, Busto R, Watson BD, Scheinberg P, Ginsberg MD. Photochemically induced cerebral infarction. II. Edema and blood-brain barrier disruption. *Acta Neuropathol* 1987a; 72: 326-34.

- Dietrich WD, Watson BD, Busto R, Ginsberg MD, Bethea JR. Photochemically induced cerebral infarction. I. Early microvascular alterations. *Acta Neuropathol* 1987b; 72: 315-25.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22: 391-7.
- Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS, Harms H, Meisel C, Ziemssen T, et al. Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke* 2007; 38: 770-3.
- Doerfler A, Engelhorn T, Heiland S, Knauth M, Wanke I, Forsting M. MR contrast agents in acute experimental cerebral ischemia: potential adverse impacts on neurologic outcome and infarction size. *J Magn Reson Imaging* 2000; 11: 418-24.
- Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia* 2001; 36: 180-90.
- Dore S, Otsuka T, Mito T, Sugo N, Hand T, Wu L, et al. Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 increases cerebral infarction. *Ann Neurol* 2003; 54: 155-62.
- Dousset V, Ballarino L, Delalande C, Coussemaq M, Canioni P, Petry KG, et al. Comparison of ultrasmall particles of iron oxide (USPIO)-enhanced T2-weighted, conventional T2-weighted, and gadolinium-enhanced T1-weighted MR images in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999a; 20: 223-7.
- Dousset V, Delalande C, Ballarino L, Quesson B, Seilhan D, Coussemaq M, et al. In vivo macrophage activity imaging in the central nervous system detected by magnetic resonance. *Magn Reson Med* 1999b; 41: 329-33.
- Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 906-11.
- Durukan A, Strbian D, Tatlisumak T. Rodent models of ischemic stroke: a useful tool for stroke drug development. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 359-70.
- Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 87: 179-97.
- Duverger D, MacKenzie ET. The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988; 8: 449-61.
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1298-307.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13632-7.
- Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 1996; 16: 2508-21.
- Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, et al. 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: 1399-419.
- Engberink RD, Blezer EL, Hoff EI, van der Pol SM, van der Toorn A, Dijkhuizen RM, et al. MRI of monocyte infiltration in an animal model of neuroinflammation using SPIO-labeled monocytes or free USPIO. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 841-51.
- Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 2005; 26: 485-95.
- Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor- α . *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994; 6: 341-60.
- Fitzgerald GA. Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1709-11.
- Fleige G, Nolte C, Synowitz M, Seeberger F, Kettenmann H, Zimmer C. Magnetic labeling of activated microglia in experimental gliomas. *Neoplasia* 2001; 3: 489-99.
- Fleige G, Seeberger F, Laux D, Kresse M, Taupitz M, Pilgrimm H, et al. In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking. *Invest Radiol* 2002; 37: 482-8.
- Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 2006; 311: 83-7.

- Fordyce CB, Jagasia R, Zhu X, Schlichter LC. Microglia Kv1.3 channels contribute to their ability to kill neurons. *J Neurosci* 2005; 25: 7139-49.
- Frankhauser R, Luginbühl, H., McGrath, J.T. . Cerebrovascular disease in various animal species. *Ann NY Acad Sci* 1965; 127: 817-860.
- Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol* 1989; 19: 689-94.
- Frenkel D, Huang Z, Maron R, Koldzic DN, Hancock WW, Moskowitz MA, et al. Nasal vaccination with myelin oligodendrocyte glycoprotein reduces stroke size by inducing IL-10-producing CD4+ T cells. *J Immunol* 2003; 171: 6549-55.
- Frenkel D, Huang Z, Maron R, Koldzic DN, Moskowitz MA, Weiner HL. Neuroprotection by IL-10-producing MOG CD4+ T cells following ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2005; 233: 125-32.
- Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003; 348: 1365-75.
- Frijns CJ, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2002; 33: 2115-22.
- Fujii M, Hara H, Meng W, Vonsattel JP, Huang Z, Moskowitz MA. Strain-related differences in susceptibility to transient forebrain ischemia in SV-129 and C57black/6 mice. *Stroke* 1997; 28: 1805-10; discussion 1811.
- Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res* 1999; 842: 92-100.
- Fuxe K, Bjelke B, Andbjør B, Grahm H, Rimondini R, Agnati LF. Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. *Neuroreport* 1997; 8: 2623-9.
- Gaasch JA, Lockman PR, Geldenhuys WJ, Allen DD, Van der Schyf CJ. Brain iron toxicity: differential responses of astrocytes, neurons, and endothelial cells. *Neurochem Res* 2007; 32: 1196-208.
- Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 1997; 20: 471-7.
- Garcia JH, Liu KF, Relton JK. Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. *Am J Pathol* 1995; 147: 1477-86.
- 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: 188-99.
- Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 2005; 123: 321-34.
- Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 1393-400.
- Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 1020-8.
- Gaspary H, Graham SH, Sagar SM, Sharp FR. HSP70 heat shock protein induction following global ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 34: 327-32.
- Gautier S, Petrault O, Gele P, Laprais M, Bastide M, Bauters A, et al. Involvement of thrombolysis in recombinant tissue plasminogen activator-induced cerebral hemorrhages and effect on infarct volume and postischemic endothelial function. *Stroke* 2003; 34: 2975-9.
- Gee JM, Kalil A, Thullbery M, Becker KJ. Induction of immunologic tolerance to myelin basic protein prevents central nervous system autoimmunity and improves outcome after stroke. *Stroke* 2008; 39: 1575-82.
- Gehrmann J, Mies G, Bonnekoh P, Banati R, Iijima T, Kreutzberg GW, et al. Microglial reaction in the rat cerebral cortex induced by cortical spreading depression. *Brain Pathol* 1993; 3: 11-7.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; 19: 71-82.

- Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 2009; 40: 1849-57.
- Gensel JC, Nakamura S, Guan Z, van Rooijen N, Ankeny DP, Popovich PG. Macrophages promote axon regeneration with concurrent neurotoxicity. *J Neurosci* 2009; 29: 3956-68.
- Gerhard A, Neumaier B, Elitok E, Glatting G, Ries V, Tomczak R, et al. In vivo imaging of activated microglia using [¹¹C]PK11195 and positron emission tomography in patients after ischemic stroke. *Neuroreport* 2000; 11: 2957-60.
- Gerhard A, Schwarz J, Myers R, Wise R, Banati RB. Evolution of microglial activation in patients after ischemic stroke: a [¹¹C](R)-PK11195 PET study. *Neuroimage* 2005; 24: 591-5.
- Gerriets T, Li F, Silva MD, Meng X, Brevard M, Sotak CH, et al. The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Methods* 2003; 122: 201-11.
- Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Rottger C, Kluge A, et al. Complications and pitfalls in rat stroke models for middle cerebral artery occlusion: a comparison between the suture and the macrosphere model using magnetic resonance angiography. *Stroke* 2004; 35: 2372-7.
- Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, et al. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H558-68.
- Ginsberg MD, Sternau LL, Globus MY, Dietrich WD, Busto R. Therapeutic modulation of brain temperature: relevance to ischemic brain injury. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1992; 4: 189-225.
- Giulian D, Vaca K, Corpuz M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J Neurosci* 1993; 13: 29-37.
- Gong C, Qin Z, Betz AL, Liu XH, Yang GY. Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 1998; 801: 1-8.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 23-35.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 953-64.
- Gourmala NG, Buttini M, Limonta S, Sauter A, Boddeke HW. Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *J Neuroimmunol* 1997; 74: 35-44.
- Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 99-109.
- Grau V, Scriba A, Stehling O, Steiniger B. Monocytes in the rat. *Immunobiology* 2000; 202: 94-103.
- 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.
- Grenier A A-TC, Rozé J-C, editor. *L'infirmité motrice d'origine cérébrale*, 2005.
- Gross CE, Bednar MM, Howard DB, Sporn MB. Transforming growth factor-beta 1 reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model. *Stroke* 1993; 24: 558-62.
- Gross CE, Howard DB, Dooley RH, Raymond SJ, Fuller S, Bednar MM. TGF-beta 1 post-treatment in a rabbit model of cerebral ischaemia. *Neurol Res* 1994; 16: 465-70.
- Grotta J. Why do all drugs work in animals but none in stroke patients? 2. Neuroprotective therapy. *J Intern Med* 1995; 237: 89-94.
- Guadagno JV, Warburton EA, Aigbirhio FI, Smielewski P, Fryer TD, Harding S, et al. Does the acute diffusion-weighted imaging lesion represent penumbra as well as core? A combined quantitative PET/MRI voxel-based study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24: 1249-54.
- Guglielmo MA, Chan PT, Cortez S, Stopa EG, McMillan P, Johanson CE, et al. The temporal profile and morphologic features of neuronal death in human stroke resemble those observed in experimental forebrain ischemia: the potential role of apoptosis. *Neurol Res* 1998; 20: 283-96.
- Gursoy-Ozdemir Y, Can A, Dalkara T. Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2004; 35: 1449-53.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008; 359: 1317-29.
- Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med* 2002; 8: 1363-8.

- Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1995; 26: 2120-6.
- Hammer MD, Krieger DW. Hypothermia for acute ischemic stroke: not just another neuroprotectant. *Neurologist* 2003; 9: 280-9.
- Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1387-94.
- Haqqani AS, Nestic M, Preston E, Baumann E, Kelly J, Stanimirovic D. Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and ICAT-nanoLC-MS/MS. *Faseb J* 2005; 19: 1809-21.
- Hara K, Kong DL, Sharp FR, Weinstein PR. Effect of selective inhibition of cyclooxygenase 2 on temporary focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett* 1998; 256: 53-6.
- Haring HP, Akamine BS, Habermann R, Koziol JA, Del Zoppo GJ. Distribution of integrin-like immunoreactivity on primate brain microvasculature. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 236-45.
- Hartemink KJ, Wisselink W, Rauwerda JA, Girbes AR, Polderman KH. Novel applications of therapeutic hypothermia: report of three cases. *Crit Care* 2004; 8: R343-6.
- Hartman RE, Lee JM, Zipfel GJ, Wozniak DF. Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2005; 1043: 48-56.
- Hayashi Y, Tomimatsu Y, Suzuki H, Yamada J, Wu Z, Yao H, et al. The intra-arterial injection of microglia protects hippocampal CA1 neurons against global ischemia-induced functional deficits in rats. *Neuroscience* 2006; 142: 87-96.
- He Y, Hua Y, Liu W, Hu H, Keep RF, Xi G. Effects of cerebral ischemia on neuronal hemoglobin. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 596-605.
- He Z, Yamawaki T, Yang S, Day AL, Simpkins JW, Naritomi H. Experimental model of small deep infarcts involving the hypothalamus in rats: changes in body temperature and postural reflex. *Stroke* 1999; 30: 2743-51; discussion 2751.
- Heiss WD. Flow thresholds of functional and morphological damage of brain tissue. *Stroke* 1983; 14: 329-31.
- Heiss WD. Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 1276-93.
- Heiss WD, Kracht LW, Thiel A, Grond M, Pawlik G. Penumbra probability thresholds of cortical flumazenil binding and blood flow predicting tissue outcome in patients with cerebral ischaemia. *Brain* 2001; 124: 20-9.
- Heiss WD, Sobesky J, Hesselmann V. Identifying thresholds for penumbra and irreversible tissue damage. *Stroke* 2004; 35: 2671-4.
- Henning EC, Ruetzler CA, Gaudinski MR, Hu TC, Latour LL, Hallenbeck JM, et al. Feridex preloading permits tracking of CNS-resident macrophages after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 1229-39.
- Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 51-70.
- Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 624-33.
- Hickey WF, Vass K, Lassmann H. Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992; 51: 246-56.
- Horn M, Schlote W. Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia. *Acta Neuropathol* 1992; 85: 79-87.
- Hossmann KA. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1996; 8: 195-208.
- Hu BR, Park M, Martone ME, Fischer WH, Ellisman MH, Zivin JA. Assembly of proteins to postsynaptic densities after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998; 18: 625-33.
- Hua F, Ma J, Li Y, Ha T, Xia Y, Kelley J, et al. The development of a novel mouse model of transient global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2006; 400: 69-74.
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 2006; 66: 232-45.

- Huang Y, Liu J, Wang LZ, Zhang WY, Zhu XZ. Neuroprotective effects of cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib against toxicity of LPS-stimulated macrophages toward motor neurons. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 952-8.
- Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 1994; 265: 1883-5.
- Hudgins WR, Garcia JH. The effect of electrocautery, atmospheric exposure, and surgical retraction on the permeability of the blood-brain-barrier. *Stroke* 1970; 1: 375-80.
- Hughes PM, Allegrini PR, Rudin M, Perry VH, Mir AK, Wiessner C. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 308-17.
- Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 621-7.
- Hurn PD, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Kaler LJ, Vandenberg AA, et al. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 1798-805.
- Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997; 20: 132-9.
- Iadecola C, Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol* 2001; 14: 89-94.
- Iadecola C, Forster C, Nogawa S, Clark HB, Ross ME. Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 1999; 98: 9-14.
- Iadecola C, Gorelick PB. The Janus face of cyclooxygenase-2 in ischemic stroke: shifting toward downstream targets. *Stroke* 2005; 36: 182-5.
- Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, Zhao X, Nagayama M, Araki E, et al. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1294-9.
- Iadecola C, Ross ME. Molecular pathology of cerebral ischemia: delayed gene expression and strategies for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 835: 203-17.
- Iadecola C, Zhang F, Casey R, Clark HB, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 1996; 27: 1373-80.
- Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 378-84.
- Imai F, Suzuki H, Oda J, Ninomiya T, Ono K, Sano H, et al. Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 488-500.
- Imai H, Konno K, Nakamura M, Shimizu T, Kubota C, Seki K, et al. A new model of focal cerebral ischemia in the miniature pig. *J Neurosurg* 2006; 104: 123-32.
- 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, D'Urso D, Gillen C, Stoll G. Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system. *Am J Pathol* 1998; 152: 975-82.
- Jander S, Schroeter M, Saleh A. Imaging inflammation in acute brain ischemia. *Stroke* 2007; 38: 642-5.
- Jansen O, Schellinger P, Fiebach J, Hacke W, Sartor K. Early recanalisation in acute ischaemic stroke saves tissue at risk defined by MRI. *Lancet* 1999; 353: 2036-7.
- Jourdain P, Nikonenko I, Alberi S, Muller D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. *J Neurosci* 2002; 22: 3108-16.
- Jung CW. Surface properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil. *Magn Reson Imaging* 1995; 13: 675-91.
- Jung CW, Jacobs P. Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil. *Magn Reson Imaging* 1995; 13: 661-74.
- Kahn K. The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil. *Neurology* 1972; 22: 510-5.
- Kameyama M, Suzuki J, Shirane R, Ogawa A. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat--three vessel occlusion model. *Stroke* 1985; 16: 489-93.

- Kamiya T, Katayama Y, Kashiwagi F, Terashi A. The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke* 1993; 24: 571-5; discussion 575-6.
- Kastrup A, Engelhorn T, Beaulieu C, de Crespigny A, Moseley ME. Dynamics of cerebral injury, perfusion, and blood-brain barrier changes after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 1999; 166: 91-9.
- 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: 203-12.
- Kaufman CL, Williams M, Ryle LM, Smith TL, Tanner M, Ho C. Superparamagnetic iron oxide particles transactivator protein-fluorescein isothiocyanate particle labeling for in vivo magnetic resonance imaging detection of cell migration: uptake and durability. *Transplantation* 2003; 76: 1043-6.
- Kaur C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA. Origin of microglia. *Microsc Res Tech* 2001; 54: 2-9.
- Kaushal V, Schlichter LC. Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. *J Neurosci* 2008; 28: 2221-30.
- Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006; 7: 131-7.
- Kellar KE, Fujii DK, Gunther WH, Briley-Saebo K, Spiller M, Koenig SH. 'NC100150', a preparation of iron oxide nanoparticles ideal for positive-contrast MR angiography. *Magma* 1999; 8: 207-13.
- Kelly-Hayes M, Beiser A, Kase CS, Scaramucci A, D'Agostino RB, Wolf PA. The influence of gender and age on disability following ischemic stroke: the Framingham study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2003; 12: 119-26.
- Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, et al. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the Biomarker Evaluation for Antioxidant Therapies in Stroke (BEAT-Stroke) study. *Stroke* 2008; 39: 100-4.
- Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* 1992; 176: 1355-64.
- Kidwell CS, Saver JL, Starkman S, Duckwiler G, Jahan R, Vespa P, et al. Late secondary ischemic injury in patients receiving intraarterial thrombolysis. *Ann Neurol* 2002; 52: 698-703.
- Kiefer R, Schweitzer T, Jung S, Toyka KV, Hartung HP. Sequential expression of transforming growth factor-beta1 by T-cells, macrophages, and microglia in rat spinal cord during autoimmune inflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 385-95.
- Kim J, Kim DI, Lee SK, Kim DJ, Lee JE, Ahn SK. Imaging of the inflammatory response in reperfusion injury after transient cerebral ischemia in rats: correlation of superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging with histopathology. *Acta Radiol* 2008; 49: 580-8.
- Kircher MF, Mahmood U, King RS, Weissleder R, Josephson L. A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation. *Cancer Res* 2003; 63: 8122-5.
- Kirsch JR, Traystman RJ, Hurn PD. Anesthetics and cerebroprotection: experimental aspects. *Int Anesthesiol Clin* 1996; 34: 73-93.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Yang G, Mabuchi T, Yagita Y, Hori M, et al. Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture occlusion in mice: evaluation of the patency of the posterior communicating artery. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 570-9.
- Kitamura T, Miyake T, Fujita S. Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 1984; 226: 421-33.
- Kitamura Y, Takata K, Inden M, Tsuchiya D, Yanagisawa D, Nakata J, et al. Intracerebroventricular injection of microglia protects against focal brain ischemia. *J Pharmacol Sci* 2004; 94: 203-6.
- Kitamura Y, Yanagisawa D, Inden M, Takata K, Tsuchiya D, Kawasaki T, et al. Recovery of focal brain ischemia-induced behavioral dysfunction by intracerebroventricular injection of microglia. *J Pharmacol Sci* 2005; 97: 289-93.

- Klehmet J, Harms H, Richter M, Prass K, Volk HD, Dirnagl U, et al. Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience* 2009; 158: 1184-93.
- Kleinschnitz C, Bendszus M, Frank M, Solymosi L, Toyka KV, Stoll G. In vivo monitoring of macrophage infiltration in experimental ischemic brain lesions by magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 1356-61.
- Kleinschnitz C, Schutz A, Nolte I, Horn T, Frank M, Solymosi L, et al. In vivo detection of developing vessel occlusion in photothrombotic ischemic brain lesions in the rat by iron particle enhanced MRI. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 1548-55.
- Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 1992; 23: 1367-79.
- koizumi J, Yoshida, Y., Nakazawa, T., Ooneda, G. Experimental studies of ischemic brain edema: I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn Stroke J* 1986; 8: 1-8.
- Kooijman R, Sarre S, Michotte Y, De Keyser J. Insulin-like growth factor I: a potential neuroprotective compound for the treatment of acute ischemic stroke? *Stroke* 2009; 40: e83-8.
- Kosugi T, Kawahara K. Reversed astrocytic GLT-1 during ischemia is crucial to excitotoxic death of neurons, but contributes to the survival of astrocytes themselves. *Neurochem Res* 2006; 31: 933-43.
- Kovalenko T, Osadchenko I, Nikonenko A, Lushnikova I, Voronin K, Nikonenko I, et al. Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus* 2006; 16: 814-25.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996; 19: 312-8.
- Krieger DW, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? *Stroke* 2004; 35: 1482-9.
- Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 1998; 29: 705-18.
- Kriz J, Lalancette-Hebert M. Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 497-509.
- Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, et al. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 2005; 48: 196-206.
- Lai AY, Todd KG. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84: 49-59.
- Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 2007; 27: 2596-605.
- Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, et al. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J Neurosci* 2009; 29: 1319-30.
- Lambertsen KL, Clausen BH, Fenger C, Wulf H, Owens T, Dagnaes-Hansen F, et al. Microglia and macrophages express tumor necrosis factor receptor p75 following middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 2007; 144: 934-49.
- Lanier WL. Cerebral metabolic rate and hypothermia: their relationship with ischemic neurologic injury. *J Neurosurg Anesthesiol* 1995; 7: 216-21.
- Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 2000; 31: 3034-40.
- Lassmann H, Zimprich F, Vass K, Hickey WF. Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res* 1991; 28: 236-43.
- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev* 2008; 108: 2064-110.
- Lees GJ. The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *J Neurol Sci* 1993; 114: 119-22.

- Lehnardt S, Lehmann S, Kaul D, Tschimmel K, Hoffmann O, Cho S, et al. Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia. *J Neuroimmunol* 2007; 190: 28-33.
- 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: 461-76.
- Lehrmann E, Kiefer R, Christensen T, Toyka KV, Zimmer J, Diemer NH, et al. Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor-beta1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Glia* 1998; 24: 437-48.
- Lehrmann E, Kiefer R, Finsen B, Diemer NH, Zimmer J, Hartung HP. Cytokines in cerebral ischemia: expression of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta 1) mRNA in the postischemic adult rat hippocampus. *Exp Neurol* 1995; 131: 114-23.
- Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975; 78: 71-100.
- Leone C, Le Pavec G, Meme W, Porcheray F, Samah B, Dormont D, et al. Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells. *Glia* 2006; 54: 183-92.
- Levine S, Sohn D. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis. *Arch Pathol* 1969; 87: 315-7.
- Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 410-4.
- Li F, Han S, Tatlisumak T, Carano RA, Irie K, Sotak CH, et al. A new method to improve in-bore middle cerebral artery occlusion in rats: demonstration with diffusion- and perfusion-weighted imaging. *Stroke* 1998; 29: 1715-9; discussion 1719-20.
- Li F, Omae T, Fisher M. Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke* 1999; 30: 2464-70; discussion 2470-1.
- Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 2009; 15: 192-9.
- Lin M, Jackson P, Tester AM, Diaconu E, Overall CM, Blalock JE, et al. Matrix metalloproteinase-8 facilitates neutrophil migration through the corneal stromal matrix by collagen degradation and production of the chemotactic peptide Pro-Gly-Pro. *Am J Pathol* 2008; 173: 144-53.
- Ling EA, Kaur C, Lu J. Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epilexus cells. *Microsc Res Tech* 1998; 41: 43-56.
- Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79: 1431-568.
- Liu B, Wang K, Gao HM, Mandavilli B, Wang JY, Hong JS. Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *J Neurochem* 2001; 77: 182-9.
- Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guernonprez P, Meredith MM, Yao K, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 2009; 324: 392-7.
- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, et al. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 1994; 25: 1481-8.
- Lobysheva NV, Tonshin AA, Selin AA, Yaguzhinsky LS, Nartsissov YR. Diversity of neurodegenerative processes in the model of brain cortex tissue ischemia. *Neurochem Int* 2009; 54: 322-9.
- Love S, Barber R, Srinivasan A, Wilcock GK. Activation of caspase-3 in permanent and transient brain ischaemia in man. *Neuroreport* 2000; 11: 2495-9.
- Lu YZ, Lin CH, Cheng FC, Hsueh CM. Molecular mechanisms responsible for microglia-derived protection of Sprague-Dawley rat brain cells during in vitro ischemia. *Neurosci Lett* 2005; 373: 159-64.
- Lyons SA, Kettenmann H. Oligodendrocytes and microglia are selectively vulnerable to combined hypoxia and hypoglycemia injury in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 521-30.
- Mabuchi T, Kitagawa K, Ohtsuki T, Kuwabara K, Yagita Y, Yanagihara T, et al. Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2000; 31: 1735-43.
- MacDonald VD, Sundt TM, Jr., Winkelmann RK. Histochemical studies in the zone of ischemia following middle cerebral artery occlusion in cats. *J Neurosurg* 1972; 37: 45-54.
- Macrae I. New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol* 1992; 34: 302-8.

- Macrae IM, Robinson MJ, Graham DI, Reid JL, McCulloch J. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13: 276-84.
- Mahnke K, Bedke T, Enk AH. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol* 2007; 250: 1-13.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
- Mallat M, Houlgatte R, Brachet P, Prochiantz A. Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro. *Dev Biol* 1989; 133: 309-11.
- Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 2005; 23: 344-6.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25: 677-86.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23: 549-55.
- Markus R, Donnan G, Kazui S, Read S, Reutens D. Penumbra topography in human stroke: methodology and validation of the 'Penumbrogram'. *Neuroimage* 2004; 21: 1252-9.
- Marsh BJ, Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke. *Neuroscience* 2009; 158: 1007-20.
- Matsuda S, Umeda M, Kato H, Araki T. Glial damage after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Mol Neurosci* 2009; 38: 220-6.
- Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, et al. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke* 1994; 25: 1469-75.
- Mayzel-Oreg O, Omae T, Kazemi M, Li F, Fisher M, Cohen Y, et al. Microsphere-induced embolic stroke: an MRI study. *Magn Reson Med* 2004; 51: 1232-8.
- McIlvoy LH. The effect of hypothermia and hyperthermia on acute brain injury. *AACN Clin Issues* 2005; 16: 488-500.
- McNeill H, Williams C, Guan J, Dragunow M, Lawlor P, Sirimanne E, et al. Neuronal rescue with transforming growth factor-beta 1 after hypoxic-ischaemic brain injury. *Neuroreport* 1994; 5: 901-4.
- Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 1948; 29: 58-69.
- Meloni BP, Campbell K, Zhu H, Knuckey NW. In search of clinical neuroprotection after brain ischemia: the case for mild hypothermia (35 degrees C) and magnesium. *Stroke* 2009; 40: 2236-40.
- Metcalf D. The granulocyte-macrophage regulators: reappraisal by gene inactivation. *Exp Hematol* 1995; 23: 569-72.
- Metz S, Bonaterra G, Rudelius M, Settles M, Rummeny EJ, Daldrup-Link HE. Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro. *Eur Radiol* 2004; 14: 1851-8.
- Meyer FB, Anderson RE, Yaksh TL, Sundt TM, Jr. Effect of nimodipine on intracellular brain pH, cortical blood flow, and EEG in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 1986; 64: 617-26.
- Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, et al. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1544-53.
- Minami M, Satoh M. Chemokines and their receptors in the brain: pathophysiological roles in ischemic brain injury. *Life Sci* 2003; 74: 321-7.
- Minghetti L, Visentin S, Patrizio M, Franchini L, Ajmone-Cat MA, Levi G. Multiple actions of the human immunodeficiency virus type-1 Tat protein on microglial cell functions. *Neurochem Res* 2004; 29: 965-78.

- Mitrasinovic OM, Perez GV, Zhao F, Lee YL, Poon C, Murphy GM, Jr. Overexpression of macrophage colony-stimulating factor receptor on microglial cells induces an inflammatory response. *J Biol Chem* 2001; 276: 30142-9.
- Miwa T, Furukawa S, Nakajima K, Furukawa Y, Kohsaka S. Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J Neurosci Res* 1997; 50: 1023-9.
- Miyake S, Yamamura T. NKT cells and autoimmune diseases: unraveling the complexity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007; 314: 251-67.
- Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 2001; 413: 531-4.
- Mocco J, Choudhri T, Huang J, Harfeldt E, Efros L, Klingbeil C, et al. HuEP5C7 as a humanized monoclonal anti-E/P-selectin neurovascular protective strategy in a blinded placebo-controlled trial of nonhuman primate stroke. *Circ Res* 2002; 91: 907-14.
- Molinari GF, Laurent, J.P. A classification of experimental models of brain ischemia. *stroke* 1976; 7.
- Montero M, Gonzalez B, Zimmer J. Immunotoxic depletion of microglia in mouse hippocampal slice cultures enhances ischemia-like neurodegeneration. *Brain Res* 2009.
- Moore A, Weissleder R, Bogdanov A, Jr. Uptake of dextran-coated monocrySTALLINE iron oxides in tumor cells and macrophages. *J Magn Reson Imaging* 1997; 7: 1140-5.
- Mori E, del Zoppo GJ, Chambers JD, Copeland BR, Arfors KE. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke* 1992; 23: 712-8.
- Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *Jama* 2001; 286: 954-9.
- Muller RN, Gillis P, Moyny F, Roch A. Transverse relaxivity of particulate MRI contrast media: from theories to experiments. *Magn Reson Med* 1991; 22: 178-82; discussion 195-6.
- Murakami K, Kondo T, Kawase M, Chan PH. The development of a new mouse model of global ischemia: focus on the relationships between ischemia duration, anesthesia, cerebral vasculature, and neuronal injury following global ischemia in mice. *Brain Res* 1998; 780: 304-10.
- Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1436-42.
- Mydel P, Shipley JM, Adair-Kirk TL, Kelley DG, Broekelmann TJ, Mecham RP, et al. Neutrophil elastase cleaves laminin-332 (laminin-5) generating peptides that are chemotactic for neutrophils. *J Biol Chem* 2008; 283: 9513-22.
- Myers R, Manjil LG, Cullen BM, Price GW, Frackowiak RS, Cremer JE. Macrophage and astrocyte populations in relation to [3H]PK 11195 binding in rat cerebral cortex following a local ischaemic lesion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991a; 11: 314-22.
- Myers R, Manjil LG, Frackowiak RS, Cremer JE. [3H]PK 11195 and the localisation of secondary thalamic lesions following focal ischaemia in rat motor cortex. *Neurosci Lett* 1991b; 133: 20-4.
- Nabika T, Cui Z, Masuda J. The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: how good is it as a model for cerebrovascular diseases? *Cell Mol Neurobiol* 2004; 24: 639-46.
- Nadeau S, Rivest S. Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia. *J Neurosci* 2000; 20: 3456-68.
- Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004; 4: 65-84.
- Nakashima K, Todd MM. Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarization. *Stroke* 1996; 27: 913-8.
- Napoli I, Neumann H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 2009; 158: 1030-8.
- Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986; 163: 740-5.

- Nayak AR, Kashyap RS, Purohit HJ, Kabra D, Taori GM, Dagainawala HF. Evaluation of the inflammatory response in sera from acute ischemic stroke patients by measurement of IL-2 and IL-10. *Inflamm Res* 2009.
- Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, Ullrich O, Reymann KG, Dinkel K. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *Faseb J* 2006; 20: 714-6.
- Neumann J, Sauerzweig S, Ronicke R, Gunzer F, Dinkel K, Ullrich O, et al. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *J Neurosci* 2008; 28: 5965-75.
- Neuwelt EA, Varallyay P, Bago AG, Muldoon LL, Nesbit G, Nixon R. Imaging of iron oxide nanoparticles by MR and light microscopy in patients with malignant brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004; 30: 456-71.
- Nighoghossian N, Wiart M, Cakmak S, Berthezene Y, Derex L, Cho TH, et al. Inflammatory response after ischemic stroke: a USPIO-enhanced MRI study in patients. *Stroke* 2007; 38: 303-7.
- Nikonenko I, Jourdain P, Muller D. Presynaptic remodeling contributes to activity-dependent synaptogenesis. *J Neurosci* 2003; 23: 8498-505.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308: 1314-8.
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 1997; 17: 2746-55.
- O'Brien MD, Waltz AG. Transorbital approach for occluding the middle cerebral artery without craniectomy. *Stroke* 1973; 4: 201-6.
- O'Donnell SL, Frederick TJ, Krady JK, Vannucci SJ, Wood TL. IGF-I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain. *Glia* 2002; 39: 85-97.
- Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006a; 26: 654-65.
- Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol* 2006b; 176: 6523-31.
- Offner H, Vandenbark AA, Hurn PD. Effect of experimental stroke on peripheral immunity: CNS ischemia induces profound immunosuppression. *Neuroscience* 2009; 158: 1098-111.
- Ois A, Cuadrado-Godia E, Solano A, Perich-Alsina X, Roquer J. Acute ischemic stroke in anterior choroidal artery territory. *J Neurol Sci* 2009; 281: 80-4.
- 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: 202-11.
- Olson EE, McKeon RJ. Characterization of cellular and neurological damage following unilateral hypoxia/ischemia. *J Neurol Sci* 2004; 227: 7-19.
- Orion D, Schwammenthal Y, Reshef T, Schwartz R, Tsabari R, Merzeliak O, et al. Interleukin-6 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in acute brain ischaemia. *Eur J Neurol* 2008; 15: 323-8.
- Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, Maubert E, et al. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 2007; 38: 2771-8.
- Palaniyar N, Nadesalingam J, Clark H, Shih MJ, Dodds AW, Reid KB. Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin. *J Biol Chem* 2004; 279: 32728-36.
- Pang L, Ye W, Che XM, Roessler BJ, Betz AL, Yang GY. Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral-mediated transforming growth factor-ss1 expression. *Stroke* 2001; 32: 544-52.
- Pappata S, Levasseur M, Gunn RN, Myers R, Crouzel C, Syrota A, et al. Thalamic microglial activation in ischemic stroke detected in vivo by PET and [11C]PK1195. *Neurology* 2000; 55: 1052-4.
- Passlick B, Fliieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989; 74: 2527-34.
- Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005; 50: 427-34.

- Pelidou SH, Kostulas N, Matusевичius 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: 437-42.
- Pendlebury ST, Rothwell PM. Risk of recurrent stroke, other vascular events and dementia after transient ischaemic attack and stroke. *Cerebrovasc Dis* 2009; 27 Suppl 3: 1-11.
- Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 1985; 15: 313-26.
- Petito CK, Olarte JP, Roberts B, Nowak TS, Jr., Pulsinelli WA. Selective glial vulnerability following transient global ischemia in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 231-8.
- Petry KG, Boiziau C, Dousset V, Brochet B. Magnetic resonance imaging of human brain macrophage infiltration. *Neurotherapeutics* 2007; 4: 434-42.
- Pforte C, Henrich-Noack P, Baldauf K, Reymann KG. Increase in proliferation and gliogenesis but decrease of early neurogenesis in the rat forebrain shortly after transient global ischemia. *Neuroscience* 2005; 136: 1133-46.
- Pinteaux E, Rothwell NJ, Boutin H. Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia. *Glia* 2006; 53: 551-6.
- Polanczyk MJ, Hopke C, Vandenberg AA, Offner H. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J Neurosci Res* 2006; 84: 370-8.
- Polfliet MM, van de Veerdonk F, Dopp EA, van Kesteren-Hendrikx EM, van Rooijen N, Dijkstra CD, et al. The role of perivascular and meningeal macrophages in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2002; 122: 1-8.
- Polmar SH, Sherman, D.S. Double-blind, randomized, placebocontrolled, parallel-group trial of the efficacy and safety of enlimomab (anti-ICAM-1) compared to placebo administered within 6 hours of the onset of symptoms for the treatment of acute ischemic stroke. Double-blind, randomized, placebocontrolled, parallel-group trial of the efficacy and safety of enlimomab (anti-ICAM-1) compared to placebo administered within 6 hours of the onset of symptoms for the treatment of acute ischemic stroke., 1996.
- Powers WJ, Grubb RL, Jr., Raichle ME. Physiological responses to focal cerebral ischemia in humans. *Ann Neurol* 1984; 16: 546-52.
- Pradillo JM, Romera C, Hurtado O, Cardenas A, Moro MA, Leza JC, et al. TNFR1 upregulation mediates tolerance after brain ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 193-203.
- Prass K, Meisel C, Hoflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, et al. 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* 2003; 198: 725-36.
- Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES, Jr., Liao H, Yan SF, Pinsky DJ. CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. *Stroke* 1999; 30: 1110-7.
- Price CJ, Wang D, Menon DK, Guadagno JV, Cleij M, Fryer T, et al. Intrinsic activated microglia map to the peri-infarct zone in the subacute phase of ischemic stroke. *Stroke* 2006; 37: 1749-53.
- Price CJ, Warburton EA, Menon DK. Human cellular inflammation in the pathology of acute cerebral ischaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 1476-84.
- Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1982; 11: 491-8.
- Qin L, Liu Y, Wang T, Wei SJ, Block ML, Wilson B, et al. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J Biol Chem* 2004; 279: 1415-21.
- Raivich G. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci* 2005; 28: 571-3.

- Raivich G, Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 46: 261-81.
- Rallidis LS, Vikelis M, Panagiotakos DB, Rizos I, Zolindaki MG, Kaliva K, et al. Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischaemic stroke. *Atherosclerosis*. Vol 189, 2006: 193-7.
- Ramsay SC, Weiller C, Myers R, Cremer JE, Luthra SK, Lammertsma AA, et al. Monitoring by PET of macrophage accumulation in brain after ischaemic stroke. *Lancet* 1992; 339: 1054-5.
- Rappolee DA, Werb Z. Secretory products of phagocytes. *Curr Opin Immunol* 1988; 1: 47-55.
- Rausch M, Baumann D, Neubacher U, Rudin M. In-vivo visualization of phagocytotic cells in rat brains after transient ischemia by USPIO. *NMR Biomed* 2002; 15: 278-83.
- Rausch M, Hiestand P, Baumann D, Cannel C, Rudin M. MRI-based monitoring of inflammation and tissue damage in acute and chronic relapsing EAE. *Magn Reson Med* 2003; 50: 309-14.
- Rausch M, Sauter A, Frohlich J, Neubacher U, Radu EW, Rudin M. Dynamic patterns of USPIO enhancement can be observed in macrophages after ischemic brain damage. *Magn Reson Med* 2001; 46: 1018-22.
- Raynal I, Prigent P, Peyramaure S, Najid A, Rebuzzi C, Corot C. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. *Invest Radiol* 2004; 39: 56-63.
- Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 1967; 34: 207-17.
- 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: 206-13.
- Rezaie P, Patel K, Male DK. Microglia in the human fetal spinal cord--patterns of distribution, morphology and phenotype. *Brain Res Dev Brain Res* 1999; 115: 71-81.
- Rezaie P, Trillo-Pazos G, Greenwood J, Everall IP, Male DK. Motility and ramification of human fetal microglia in culture: an investigation using time-lapse video microscopy and image analysis. *Exp Cell Res* 2002; 274: 68-82.
- Ritter LS, Orozco JA, Coull BM, McDonagh PF, Rosenblum WI. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke. *Stroke* 2000; 31: 1153-61.
- Robben PM, LaRegina M, Kuziel WA, Sibley LD. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med* 2005; 201: 1761-9.
- Robinson MJ, McCulloch J. Contractile responses to endothelin in feline cortical vessels in situ. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10: 285-9.
- Rogers WJ, Basu P. Factors regulating macrophage endocytosis of nanoparticles: implications for targeted magnetic resonance plaque imaging. *Atherosclerosis* 2005; 178: 67-73.
- Roiniotis J, Dinh H, Masendycz P, Turner A, Elsegood CL, Scholz GM, et al. Hypoxia prolongs monocyte/macrophage survival and enhanced glycolysis is associated with their maturation under aerobic conditions. *J Immunol* 2009; 182: 7974-81.
- Rojas S, Martin A, Arranz MJ, Pareto D, Purroy J, Verdager E, et al. Imaging brain inflammation with [(11)C]PK11195 by PET and induction of the peripheral-type benzodiazepine receptor after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 1975-86.
- Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, et al. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007; 115: e69-171.
- Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernandez-Guillamon M, Lo EH, Montaner J. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 2008; 39: 1121-6.
- Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. Vol 29, 1998: 2189-95.
- Ross AM, Hurn P, Perrin N, Wood L, Carlini W, Potempa K. Evidence of the peripheral inflammatory response in patients with transient ischemic attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2007; 16: 203-7.

- Ruocco A, Nicole O, Docagne F, Ali C, Chazalviel L, Komesli S, et al. A transforming growth factor-beta antagonist unmasks the neuroprotective role of this endogenous cytokine in excitotoxic and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 1345-53.
- Rupalla K, Allegrini PR, Sauer D, Wiessner C. Time course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathol* 1998; 96: 172-8.
- Saleh A, Schroeter M, Jonkmanns C, Hartung HP, Modder U, Jander S. In vivo MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke. *Brain* 2004a; 127: 1670-7.
- Saleh A, Schroeter M, Ringelstein A, Hartung HP, Siebler M, Modder U, et al. Iron oxide particle-enhanced MRI suggests variability of brain inflammation at early stages after ischemic stroke. *Stroke* 2007; 38: 2733-7.
- Saleh A, Wiedermann D, Schroeter M, Jonkmanns C, Jander S, Hoehn M. Central nervous system inflammatory response after cerebral infarction as detected by magnetic resonance imaging. *NMR Biomed* 2004b; 17: 163-9.
- Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 1997; 28: 1283-8.
- Sarnowska A, Braun H, Sauerzweig S, Reymann KG. The neuroprotective effect of bone marrow stem cells is not dependent on direct cell contact with hypoxic injured tissue. *Exp Neurol* 2009; 215: 317-27.
- Sasmono RT, Ehrnsperger A, Cronau SL, Ravasi T, Kandane R, Hickey MJ, et al. Mouse neutrophilic granulocytes express mRNA encoding the macrophage colony-stimulating factor receptor (CSF-1R) as well as many other macrophage-specific transcripts and can transdifferentiate into macrophages in vitro in response to CSF-1. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 111-23.
- Sasmono RT, Oceandy D, Pollard JW, Tong W, Pavli P, Wainwright BJ, et al. A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood* 2003; 101: 1155-63.
- Saver JL. Time is brain--quantified. *Stroke* 2006; 37: 263-6.
- Schabitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Scholzke MN, et al. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2003; 34: 745-51.
- Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 2003; 183: 25-33.
- Schilling M, Besselmann M, Muller M, Strecker JK, Ringelstein EB, Kiefer R. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 2005; 196: 290-7.
- Schilling M, Strecker JK, Schabitz WR, Ringelstein EB, Kiefer R. Effects of monocyte chemoattractant protein 1 on blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 2009; 161: 806-12.
- Schlaug G, Benfield A, Baird AE, Siewert B, Lovblad KO, Parker RA, et al. The ischemic penumbra: operationally defined by diffusion and perfusion MRI. *Neurology* 1999; 53: 1528-37.
- Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* 1998; 29: 2162-70.
- Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 1991; 40: 599-636.
- Schroeter M, Dennin MA, Walberer M, Backes H, Neumaier B, Fink GR, et al. Neuroinflammation extends brain tissue at risk to vital peri-infarct tissue: a double tracer [¹¹C]PK11195- and [¹⁸F]FDG-PET study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 1216-25.
- 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: 382-6.

- 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: 1367-77.
- Schroeter M, Saleh A, Wiedermann D, Hoehn M, Jander S. Histochemical detection of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) contrast medium uptake in experimental brain ischemia. *Magn Reson Med* 2004; 52: 403-6.
- Schulze E, Ferrucci JT, Jr., Poss K, Lapointe L, Bogdanova A, Weissleder R. Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro. *Invest Radiol* 1995; 30: 604-10.
- Schwab JM, Nguyen TD, Meyermann R, Schluesener HJ. Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16 (IL-16) expression confined to infiltrating granulocytes, CD8+ T-lymphocytes and activated microglia/macrophages. *J Neuroimmunol* 2001; 114: 232-41.
- Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 197-223.
- Semelka RC, Helmberger TK. Contrast agents for MR imaging of the liver. *Radiology* 2001; 218: 27-38.
- Seneterre E, Weissleder R, Jaramillo D, Reimer P, Lee AS, Brady TJ, et al. Bone marrow: ultrasmall superparamagnetic iron oxide for MR imaging. *Radiology* 1991; 179: 529-33.
- Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 421-52.
- Serot JM, Bene MC, Foliguet B, Faure GC. Monocyte-derived IL-10-secreting dendritic cells in choroid plexus epithelium. *J Neuroimmunol* 2000; 105: 115-9.
- Shapira S, Sapir M, Wengier A, Grauer E, Kadar T. Aging has a complex effect on a rat model of ischemic stroke. *Brain Res* 2002; 925: 148-58.
- 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: 865-71.
- Shellshear JL. The Arteries of the Brain of the Orang-utan. *J Anat* 1927a; 61: 167-97.
- Shellshear JL. The Evolution of the Parallel Sulcus. *J Anat* 1927b; 61: 267-78.
- Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, Graham DI. Recirculation model following MCA occlusion in rats. Cerebral blood flow, cerebrovascular permeability, and brain edema. *J Neurosurg* 1985; 63: 272-7.
- Shimamura N, Matchett G, Tsubokawa T, Ohkuma H, Zhang J. Comparison of silicon-coated nylon suture to plain nylon suture in the rat middle cerebral artery occlusion model. *J Neurosci Methods* 2006; 156: 161-5.
- Shimosegawa E, Hatazawa J, Ibaraki M, Toyoshima H, Suzuki A. Metabolic penumbra of acute brain infarction: a correlation with infarct growth. *Ann Neurol* 2005; 57: 495-504.
- Siglienti I, Bendszus M, Kleinschnitz C, Stoll G. Cytokine profile of iron-laden macrophages: implications for cellular magnetic resonance imaging. *J Neuroimmunol* 2006; 173: 166-73.
- Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 2006; 49: 489-502.
- Simon GH, Bauer J, Saborovski O, Fu Y, Corot C, Wendland MF, et al. T1 and T2 relaxivity of intracellular and extracellular USPIO at 1.5T and 3T clinical MR scanning. *Eur Radiol* 2006; 16: 738-45.
- Skibo GG, Nikonenko IR, Savchenko VL, McKanna JA. Microglia in organotypic hippocampal slice culture and effects of hypoxia: ultrastructure and lipocortin-1 immunoreactivity. *Neuroscience* 2000; 96: 427-38.
- Smith ME. Phagocytic properties of microglia in vitro: implications for a role in multiple sclerosis and EAE. *Microsc Res Tech* 2001; 54: 81-94.
- Sobesky J, Zaro Weber O, Lehnhardt FG, Hesselmann V, Neveling M, Jacobs A, et al. Does the mismatch match the penumbra? Magnetic resonance imaging and positron emission tomography in early ischemic stroke. *Stroke* 2005; 36: 980-5.
- Soriano SG, Coxon A, Wang YF, Frosch MP, Lipton SA, Hickey PR, et al. Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Stroke* 1999; 30: 134-9.
- Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett* 1998; 251: 189-92.

- Stanimirovic D, Shapiro A, Wong J, Hutchison J, Durkin J. The induction of ICAM-1 in human cerebromicrovascular endothelial cells (HCEC) by ischemia-like conditions promotes enhanced neutrophil/HCEC adhesion. *J Neuroimmunol* 1997; 76: 193-205.
- Stark DD, Weissleder R, Elizondo G, Hahn PF, Saini S, Todd LE, et al. Superparamagnetic iron oxide: clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology* 1988; 168: 297-301.
- Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007; 449: 419-26.
- Stephenson DT, Schober DA, Smalstig EB, Mincy RE, Gehlert DR, Clemens JA. Peripheral benzodiazepine receptors are colocalized with activated microglia following transient global forebrain ischemia in the rat. *J Neurosci* 1995; 15: 5263-74.
- Stoll G, Bendszus M. Imaging of inflammation in the peripheral and central nervous system by magnetic resonance imaging. *Neuroscience* 2009; 158: 1151-60.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 149-71.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1988; 1: 301-7.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 1999; 57: 563-81.
- Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, et al. Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol* 2001; 21: 427-49.
- Stroh A, Zimmer C, Werner N, Gertz K, Weir K, Kronenberg G, et al. Tracking of systemically administered mononuclear cells in the ischemic brain by high-field magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 2006; 33: 886-97.
- Strong AJ, Planas AM. Selective Neuronal Loss. In: Donnan GA, Baron J-C and Sharp FR, editors. *The ischemic penumbra*. London: Informa (healthcare), 2007: 109.
- Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol* 2007; 6: 182-7.
- Sugawara T, Lewen A, Noshita N, Gasche Y, Chan PH. Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats. *J Neurotrauma* 2002; 19: 85-98.
- Sugimoto K, Iadecola C. Delayed effect of administration of COX-2 inhibitor in mice with acute cerebral ischemia. *Brain Res* 2003; 960: 273-6.
- Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 2002; 33: 831-6.
- 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: 337-41.
- Suzuki H, Abe K, Tojo S, Kimura K, Mizugaki M, Itoyama Y. A change of P-selectin immunoreactivity in rat brain after transient and permanent middle cerebral artery occlusion. *Neurol Res* 1998; 20: 463-9.
- Takizawa S, Hogan M, Hakim AM. The effects of a competitive NMDA receptor antagonist (CGS-19755) on cerebral blood flow and pH in focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11: 786-93.
- 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.
- Tanaka R, Komine-Kobayashi M, Mochizuki H, Yamada M, Furuya T, Migita M, et al. Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience* 2003; 117: 531-9.
- Tang LL, Ye K, Yang XF, Zheng JS. Apocynin attenuates cerebral infarction after transient focal ischaemia in rats. *J Int Med Res* 2007; 35: 517-22.
- Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelso C, Jensen C, Ekholm S, et al. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke* 1995; 26: 1393-8.
- Taylor DL, Diemel LT, Cuzner ML, Pocock JM. Activation of group II metabotropic glutamate receptors underlies microglial reactivity and neurotoxicity following stimulation with

- chromogranin A, a peptide up-regulated in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2002; 82: 1179-91.
- Terao S, Yilmaz G, Stokes KY, Russell J, Ishikawa M, Kawase T, et al. Blood cell-derived RANTES mediates cerebral microvascular dysfunction, inflammation, and tissue injury after focal ischemia-reperfusion. *Stroke* 2008; 39: 2560-70.
- Thomas WS, Mori E, Copeland BR, Yu JQ, Morrissey JH, del Zoppo GJ. Tissue factor contributes to microvascular defects after focal cerebral ischemia. *Stroke* 1993; 24: 847-53; discussion 847.
- Thomson CW, Lee BP, Zhang L. Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators. *Immunol Res* 2006; 35: 163-78.
- Tonchev AB, Boneva NB, Kaplamadzhiev DB, Kikuchi M, Mori Y, Sahara S, et al. Expression of neurotrophin receptors by proliferating glia in postischemic hippocampal CA1 sector of adult monkeys. *J Neuroimmunol* 2008; 205: 20-4.
- Tsuchiya D, Hong S, Suh SW, Kayama T, Panter SS, Weinstein PR. Mild hypothermia reduces zinc translocation, neuronal cell death, and mortality after transient global ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 1231-8.
- Turrin NP, Plante MM, Lessard M, Rivest S. Irradiation does not compromise or exacerbate the innate immune response in the brains of mice that were transplanted with bone marrow stem cells. *Stem Cells* 2007; 25: 3165-72.
- Um JY, Moon KS, Lee KM, Yun JM, Cho KH, Moon BS, et al. Association of interleukin-1 alpha gene polymorphism with cerebral infarction. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 115: 50-4.
- Valable S, Barbier EL, Bernaudin M, Roussel S, Segebarth C, Petit E, et al. In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *Neuroimage* 2007; 37 Suppl 1: S47-58.
- Varallyay P, Nesbit G, Muldoon LL, Nixon RR, Delashaw J, Cohen JJ, et al. Comparison of two superparamagnetic viral-sized iron oxide particles ferumoxides and ferumoxtran-10 with a gadolinium chelate in imaging intracranial tumors. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002; 23: 510-9.
- Velier JJ, Ellison JA, Kikly KK, Spera PA, Barone FC, Feuerstein GZ. Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci* 1999; 19: 5932-41.
- Vila N, Reverter JC, Yague J, Chamorro A. Interaction between interleukin-6 and the natural anticoagulant system in acute stroke. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 325-9.
- Vilcek J, Feldmann M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 201-9.
- von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7538-42.
- von Zur Muhlen C, von Elverfeldt D, Bassler N, Neudorfer I, Steitz B, Petri-Fink A, et al. Superparamagnetic iron oxide binding and uptake as imaged by magnetic resonance is mediated by the integrin receptor Mac-1 (CD11b/CD18): implications on imaging of atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2007; 193: 102-11.
- Wagner S, Nagel S, Kluge B, Schwab S, Heiland S, Koziol J, et al. Topographically graded postischemic presence of metalloproteinases is inhibited by hypothermia. *Brain Res* 2003; 984: 63-75.
- Wahlgren NG, Ahmed N. Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies--the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis* 2004; 17 Suppl 1: 153-66.
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 2009; 29: 3974-80.
- Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 2008; 28: 8138-43.
- Walczak P, Kedziorek DA, Gilad AA, Lin S, Bulte JW. Instant MR labeling of stem cells using magnetoelectroporation. *Magn Reson Med* 2005; 54: 769-74.

- Wang HK, Park UJ, Kim SY, Lee JH, Kim SU, Gwag BJ, et al. Free radical production in CA1 neurons induces MIP-1alpha expression, microglia recruitment, and delayed neuronal death after transient forebrain ischemia. *J Neurosci* 2008a; 28: 1721-7.
- Wang RY, Wang PS, Yang YR. Effect of age in rats following middle cerebral artery occlusion. *Gerontology* 2003; 49: 27-32.
- Wang X, Rosell A, Lo EH. Targeting extracellular matrix proteolysis for hemorrhagic complications of tPA stroke therapy. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008b; 7: 235-42.
- 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* 1995; 15: 166-71.
- Warlow CP. Epidemiology of stroke. *Lancet* 1998; 352 Suppl 3: SIII1-4.
- 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.
- Weber R, Wegener S, Ramos-Cabrer P, Wiedermann D, Hoehn M. MRI detection of macrophage activity after experimental stroke in rats: new indicators for late appearance of vascular degradation? *Magn Reson Med* 2005; 54: 59-66.
- Weissleder R. Liver MR imaging with iron oxides: toward consensus and clinical practice. *Radiology* 1994; 193: 593-5.
- Weissleder R, Moore A, Mahmood U, Bhorade R, Benveniste H, Chiocca EA, et al. In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med* 2000; 6: 351-5.
- Weissleder R, Stark DD, Engelstad BL, Bacon BR, Compton CC, White DL, et al. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol* 1989; 152: 167-73.
- Weng YC, Kriz J. Differential neuroprotective effects of a minocycline-based drug cocktail in transient and permanent focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2007; 204: 433-42.
- Weston RM, Jones NM, Jarrott B, Callaway JK. Inflammatory cell infiltration after endothelin-1-induced cerebral ischemia: histochemical and myeloperoxidase correlation with temporal changes in brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 100-14.
- Wiat M. Iron oxide contrast agents. International Society for Magnetic Resonance in Medicine. Honolulu, Hawaii, USA, 2009.
- Wiat M, Davoust N, Pialat JB, Desestret V, Moucharrafié S, Cho TH, et al. MRI monitoring of neuroinflammation in mouse focal ischemia. *Stroke* 2007; 38: 131-7.
- Wiessner C, Gehrmann J, Lindholm D, Topper R, Kreutzberg GW, Hossmann KA. Expression of transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 1993; 86: 439-46.
- Winship IR, Murphy TH. In vivo calcium imaging reveals functional rewiring of single somatosensory neurons after stroke. *J Neurosci* 2008; 28: 6592-606.
- Wolswijk G. GD3+ cells in the adult rat optic nerve are ramified microglia rather than O-2Aadult progenitor cells. *Glia* 1994; 10: 244-9.
- Wu YJ, Muldoon LL, Varallyay C, Markwardt S, Jones RE, Neuwelt EA. In vivo leukocyte labeling with intravenous ferumoxides/protamine sulfate complex and in vitro characterization for cellular magnetic resonance imaging. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C1698-708.
- 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: 676-80; discussion 681.
- Yan YP, Lang BT, Vemuganti R, Dempsey RJ. Galectin-3 mediates post-ischemic tissue remodeling. *Brain Res* 2009.
- Yanaka K, Camarata PJ, Spellman SR, McCarthy JB, Furcht LT, Low WC, et al. Neuronal protection from cerebral ischemia by synthetic fibronectin peptides to leukocyte adhesion molecules. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 1120-5.
- Yang G, Kitagawa K, Matsushita K, Mabuchi T, Yagita Y, Yanagihara T, et al. C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia. *Brain Res* 1997; 752: 209-18.
- Yenari MA, Kunis D, Sun GH, Onley D, Watson L, Turner S, et al. Hu23F2G, an antibody recognizing the leukocyte CD11/CD18 integrin, reduces injury in a rabbit model of transient focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 1998; 153: 223-33.

- Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation* 2006; 113: 2105-12.
- Yokoyama A, Sakamoto A, Kameda K, Imai Y, Tanaka J. NG2 proteoglycan-expressing microglia as multipotent neural progenitors in normal and pathologic brains. *Glia* 2006; 53: 754-68.
- Yoshimoto T, Houkin K, Tada M, Abe H. Induction of cytokines, chemokines and adhesion molecule mRNA in a rat forebrain reperfusion model. *Acta Neuropathol* 1997; 93: 154-8.
- Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15769-74.
- Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 13496-500.
- Zaremba J, Losy J. The levels of TNF-alpha in cerebrospinal fluid and serum do not correlate with the counts of the white blood cells in acute phase of ischaemic stroke. *Folia Morphol (Warsz)* 2001; 60: 91-7.
- 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: 112-21.
- Zhang F, Casey RM, Ross ME, Iadecola C. Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1996; 27: 317-23.
- Zhang L, Zhang RL, Wang Y, Zhang C, Zhang ZG, Meng H, et al. Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Stroke* 2005; 36: 847-52.
- Zhang Q, Chen C, Lu J, Xie M, Pan D, Luo X, et al. Cell cycle inhibition attenuates microglial proliferation and production of IL-1beta, MIP-1alpha, and NO after focal cerebral ischemia in the rat. *Glia* 2009; 57: 908-20.
- Zhang R, Chopp M, Zhang Z, Jiang N, Powers C. The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1998a; 785: 207-14.
- Zhang RL, Chopp M, Jiang N, Tang WX, Probst J, Manning AM, et al. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke* 1995a; 26: 1438-42; discussion 1443.
- Zhang Z, Chopp M, Goussev A, Powers C. Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1998b; 784: 210-7.
- Zhang Z, Chopp M, Powers C. Temporal profile of microglial response following transient (2 h) middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1997; 744: 189-98.
- Zhang ZG, Chopp M, Tang WX, Jiang N, Zhang RL. Posts ischemic treatment (2-4 h) with anti-CD11b and anti-CD18 monoclonal antibodies are neuroprotective after transient (2 h) focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 1995b; 698: 79-85.
- Zhang ZG, Jiang Q, Zhang R, Zhang L, Wang L, Zhang L, et al. Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat. *Ann Neurol* 2003; 53: 259-63.
- Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, et al. Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci* 2002; 22: 3898-909.
- Ziegler G, Harhausen D, Schepers C, Hoffmann O, Rohr C, Prinz V, et al. TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359: 574-9.

ANNEXES

J.-C. Brisset
V. Desestret
S. Marcellino
E. Devillard
F. Chauveau
F. Lagarde
S. Nataf
N. Nighoghossian
Y. Berthezene
M. Wiart

Quantitative effects of cell internalization of two types of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles at 4.7 T and 7 T

Received: 12 March 2009
Accepted: 29 June 2009
© European Society of Radiology 2009

S. Marcellino · F. Lagarde
CNRS, UMR 5180, Laboratoire des
Sciences Analytiques,
Villeurbanne, 69100, France

J.-C. B. and V. D. contributed equally to this work.

J.-C. Brisset · V. Desestret ·
S. Marcellino · E. Devillard ·
F. Chauveau · F. Lagarde · S. Nataf ·
N. Nighoghossian · Y. Berthezene ·
M. Wiart (✉)
Université de Lyon,
Lyon 1,
Lyon, 69003, France
e-mail: wiart@creatis.univ-lyon1.fr
Tel.: +33-4-72119013
Fax: +33-4-72684916

J.-C. Brisset · V. Desestret ·
F. Chauveau · N. Nighoghossian ·
Y. Berthezene · M. Wiart
CNRS, UMR 5220, Inserm, U 630,
Insa de Lyon, Creatis-LRMN,
Bron, 69677, France

E. Devillard · S. Nataf
Inserm U842, NeuroOncologie and
NeuroInflammation,
Lyon, 69372, France

Abstract Purpose: MRI coupled with the intravenous injection of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxides (USPIOs) is a promising tool for the study of neuroinflammation. Quantification of the approximate number of magnetically labelled macrophages may provide an effective and efficient method for monitoring inflammatory cells. The purpose of the present study was to characterise the relaxation properties of macrophages labelled with two types of USPIOs, at 4.7 T and 7 T. **Methods:** USPIO-labelled bone-marrow-derived macrophage phantoms were compared with phantoms of free dispersed USPIOs with the same global iron concentration, using multi-parametric (T1, T2 and T2*) quantitative MRI. The same

protocol was then evaluated in living mice after intracerebral injection of iron-labelled macrophages vs free iron oxide. **Results:** A linear relationship was observed among R1, R2 and R2* values and iron concentration in vitro at 4.7 T and at 7 T. At a given field, T1 and T2 relaxivities of both types of USPIOs decreased following internalisation into macrophages, while T2* relaxivities increased. **Conclusion:** There was fair overall agreement between the theoretical number of injected cells and the number estimated from T2 quantification and in vitro calibration curves, supporting the validity of the present in vitro calibration curves for in vivo investigation.

Keywords MR imaging · Cell labelling · Iron oxide particles · Ferumoxtran-10 · Anionic maghemite nanoparticle · Macrophages · High field · Quantification

Introduction

MRI coupled with the intravenous injection of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxides (USPIOs) is a promising tool for the study of neuroinflammation following stroke [1, 2]. This technique is based on the in vivo phagocytosis of USPIOs by activated macrophages, and on the in situ detection of strong MR effects induced by iron-loaded macrophages. One limitation of such an approach, though, is the potentially confounding effects of free iron oxide nanoparticles on the MR signal. Indeed, inflammation conditions are often associated with enhanced

permeability [3], thus resulting in interstitial USPIO accumulation not necessarily directly related to the cellular inflammatory response [4]. Alternative cellular MRI techniques involve administration of ex vivo magnetically labelled cells and subsequent tracking of their trafficking in inflamed tissues [5, 6]. While the low cellular uptake of USPIOs is an advantage for in vivo labelling (because of the resulting long vascular remanence) [7, 8], this property makes them ill suited for in vitro labelling. In contrast, anionic maghemite nanoparticles (AMNP) have a high and nonspecific affinity for cellular membrane, thus permitting an efficient cell labelling, as demonstrated in a wide variety

of cells, including macrophages [5, 9–13]. These nanoparticles also have a high T2 relaxivity [9] and are therefore well suited for MR tracking.

To date, most studies use qualitative visual assessment of MR hypointense signals in the brain parenchyma to evaluate macrophage activity. Quantification of the approximate number of magnetically labelled macrophages may provide an effective and efficient method of monitoring neuroinflammation. The relaxation effects of iron oxide nanoparticles depend on their local concentration, compartmentalisation (inside or outside the cells), distribution in their microenvironment (interactions with surrounding protons) and on the applied field strength. Most experimental works are performed at high field (>3 T) [6, 14, 15], in order to improve spatial resolution in small animals. With the recent development of 7 T head and whole-body scanners [16, 17] clinical USPIO-enhanced MRI studies may also be performed at high field in the future, as some USPIOs, such as ferumoxtran-10, are already approved for use in humans [18, 19]. However, to our knowledge, the quantitative effects on MR signals of macrophage internalisation of USPIO or AMNP have never been reported at high fields.

In this context, the purpose of this study was to characterise the relaxation properties of macrophages labelled with two types of USPIOs (ferumoxtran-10 and AMNP), at 4.7 T and 7 T. Magnetically labelled bone-marrow-derived macrophage phantoms were compared with phantoms of free dispersed nanoparticles with the same global iron concentration, using multi-parametric (T1, T2 and T2*) quantitative MRI. The same protocol was then evaluated in living mice after intracerebral injection of iron-labelled macrophages vs free iron oxide.

Materials and methods

Contrast agents

Ferumoxtran-10 (Sinerem[®], Guerbet, Aulnay-sous-bois, France) is a dextran-coated USPIO, composed of a 4- to 6-nm crystalline iron oxide core, with a mean hydrodynamic diameter of 35 nm (range 20–50 nm). The T1 relaxivity is 9.9 mM⁻¹ s⁻¹ and the T2 relaxivity 65 mM⁻¹ s⁻¹ at 1.5 T in water at 37°C [8]. Anionic iron oxide nanoparticles (AMNP, CNRS UMR 7612, Paris, France) are negatively charged superparamagnetic nanocrystals of maghemite, composed of a magnetic core of 8.7 nm with a mean hydrodynamic diameter of 35 nm. The T1 relaxivity is 12 mM⁻¹ s⁻¹ and the T2 relaxivity 363 mM⁻¹ s⁻¹ at 1.5 T in water at 25°C [20].

Generation of bone-marrow-derived macrophages and in vitro cell labelling

Twelve-week-old female C57Bl/6 mice (Charles River, France) were sacrificed by peritoneal overdose of pento-

barbital sodium, and bone marrow (BM) cells were harvested by flushing out tibiae and femurs. Total BM cells were then seeded on uncoated flasks at 5 × 10⁵ cells/mL in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 15% fetal calf serum (Fetal Clone II, Hyclone, Logan, UT), penicillin-streptomycin (1 µg/mL) and 10 ng/mL human macrophage colony-stimulating factor (hM-CSF, PreproTech Inc, London, UK). Cultures were incubated at 37°C in a moist 5% CO₂–95% air atmosphere. Cell cultures were incubated in the absence or presence of ferumoxtran-10 ([Fe]=36 mM) for 36 h [21, 22] or AMNP ([Fe]=1 mM) for 12 h [20]. Seven days after plating and immediately after labelling, cells were detached by trypsination, and cytoplots were prepared on glass slides with centrifugation (450 rpm for 5 min), and air-dried. USPIO internalisation was assessed by Prussian blue staining on cytopun cells. With this cell culture protocol, 92% of cells express the pan-myeloid marker CD11b, as previously assessed by flow cytometry analysis [4].

MRI

MRI was performed at room temperature on Bruker Biospec 4.7 T/10-cm (birdcage coil, 50-mm inner diameter; Ettlingen, Germany) and Biospec 7 T/12-cm (birdcage coil, 72-mm inner diameter) systems, both interfaced to a Bruker PV4.0.

In vitro experiment

Uniform gel suspensions of 0.75% (w/w) low melting point agarose gel (NuSieve[®] GTG[®]) were blended in the cell culture medium Roswell Park Memorial Institute RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), and heated first in a thermostat bath up to 65°C. The contents were blended in a Vortex mixer and then cooled to a bath temperature of between 43°C and 40°C just before cells or contrast agent was added. The resultant mixture was sampled in 0.6-ml Eppendorf tubes and quickly frozen to prevent sedimentation. The cellular and iron contents of the tubes prepared for the in vitro experiments are shown in Table 1. Theoretical iron concentrations were derived from the cell numbers on the basis of an iron uptake of 0.53 pg/cell for ferumoxtran-10 and 8.1 pg/cell for AMNP (as measured in our pilot study). Actual iron concentration values were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) (see below). For all in vitro experiments, the field of view (FOV) was 70 × 70 mm² with matrix size 128 × 128. For T1-, T2- and T2*-weighted images, five transverse slices were acquired with 1-mm thickness and no gap between slices. For relaxometry measurements, three transverse slices were acquired with 2-mm thickness and a 2-mm gap between slices.

Table 1 Sample preparation and ICP-AES measurements

	Ferumoxtran-10						AMNP																	
	Free ferumoxtran-10		Ferumoxtran-10-labelled cells		Control cells		Free AMNP		AMNP-labelled cells		Control cells													
Number of cells $\times 10^6$	0	0	0	0	3.6	7	12	16	0	0	0	0	0.24	0.48	0.8	1.6	0.24	0.48	0.8	1.6				
Theoretical [Fe] (mM)	0	0.05	0.11	0.18	0.24	0.05	0.11	0.18	0.24	0	0	0	0.05	0.11	0.18	0.36	0.05	0.11	0.18	0.36	0	0	0	0
Measured [Fe] (mM)	ND	0.04	0.08	0.14	0.17	0.04	0.07	0.12	0.15	ND	ND	ND	0.05	0.10	0.17	0.31	0.06	0.12	0.14	0.36	ND	ND	ND	ND

[Fe] iron concentration, ND not detected

4.7-T experiment

T1-weighted images were acquired using a gradient-echo (FLASH) sequence with the following parameters: time of echo/time of repetition (TE/TR) 4.1/157.5 ms, flip angle 90°, 50-kHz acquisition bandwidth (BW). T2-weighted spin-echo images were acquired using a RARE sequence with TE/TR 80/4,000 ms, 50-kHz acquisition BW. T2*-weighted gradient-echo images were acquired using a FLASH sequence with TE/TR 5.4/450 ms, flip angle 10°, 50-kHz acquisition BW. T1 quantification was achieved using a spin-echo sequence with variable time of repetition (RAREVTR) TE/TR (ms) 15/[190 470 875 1,500 5,000], 50-kHz acquisition BW. T2 quantification was achieved using a Carr–Purcell–Meiboom–Gill multi-slice multi-echo (MSME) sequence with the following parameters: TE (interecho delay)/TR 15/4,000 ms, 35 echoes, 50-kHz acquisition BW. T2* quantification was achieved using a multi-gradient-echo (MGE) sequence with the following parameters: TE/TR 3.15/450 ms, flip angle 20°, interecho delay 5 ms, 12 echoes, 60-kHz acquisition BW.

7-T experiment

T1-weighted images were acquired using a FLASH sequence (TE/TR 3.6/161 ms, flip angle 50°, 50-kHz acquisition BW). T2-weighted images were acquired using a RARE sequence with TE/TR 75/3,000 ms, 25-kHz acquisition BW. T2*-weighted images were acquired using a FLASH sequence with TE/TR 5.4/468 ms, flip angle 20°, 50-kHz acquisition BW. T1 quantification was achieved using a RAREVTR sequence with the following parameters: TE/TR (ms) 15/[175 445 775 1,200 1,800 2,800 7,500], 50-kHz acquisition BW. T2 quantification was achieved using a MSME sequence with the following parameters: TE (interecho delay)/TR 12/4,000 ms, 35 echoes, 50-kHz acquisition BW. T2* quantification was achieved using a multi-gradient-echo (MGE) sequence with the following parameters: TE/TR 4/1,500 ms, flip angle 20°, interecho delay 7 ms, 12 echoes, 80-kHz acquisition BW.

In vivo experiment

Animal experiments were performed in accordance with institutional guidelines. Five healthy mice (weight 20–25 g; Charles River, France) were anaesthetised with an intraperitoneal cocktail of ketamine (90 mg/kg, Imalgène, Mérieux, Lyon, France) and xylazine (12 mg/kg, Rompun, Bayer, Germany), and stereotaxically injected (0.8 mm anterior to bregma, 2.0 mm laterally, and 2.5 mm deep from the cortical surface) with 3 μ L saline solution containing either cells (left hemisphere) or free contrast agent (right hemisphere), as detailed in Table 2. MRI was performed at

Table 2 Injection protocol and results obtained for each of the five stereotaxically injected mice

Contrast agent	Cell count	Theoretical [Fe] (mM)	Estimated [Fe] (mM)	Estimated cell count
<i>N</i> (control cells)	45,000	0	–	–
Ferumoxtran-10	45,000	0.12	0.16	59,520
Ferumoxtran-10	120,000	0.32	0.29	107,880
AMNP	7,500	0.35	0.52	11,019
AMNP	7,500	0.35	0.41	8,688

Cell count and theoretical [Fe] refer to injection protocol. Iron concentrations were estimated from T2 measurement and r2 calibration curve and cell count from iron concentration and iron load per cell

[Fe] iron concentration

7 T in the hour following cell injection, using 1% isoflurane for anaesthesia and the same sequences as in vitro, with FOV 20×20 mm² and matrix size 256×256. To improve the mouse brain signal-to-noise ratio, the birdcage coil was used for transmission only, and a 15-mm-diameter surface coil was used for reception.

Image and data analysis

All MR image data were transferred to a personal computer (1.83 GHz, 2 Gbytes) and analysed using in-house software written in Matlab script (MathWorks, Natick, MA, USA). Regions of interest (ROI) of 0.21 cm² were placed on each tube. T1s were calculated using a nonlinear least-squares curve fitting of MR signal intensity (SI), using the following fit function: $SI(k.TR) = S_0 \cdot (1 - \exp(-k.TR/T1))$, where k represents the time samples and S_0 represents the signal intensity at time 0. T2 values were calculated by linear fitting of the natural logarithm of MR signal intensity: $SI(k.TE) = S_0 \cdot \exp(k.TE/T2)$. The same fitting procedure was applied for T2* quantification. T1, T2 and T2* relaxivities (r1, r2 and r2*) were estimated as the linear regression slope, according to: $Ri = 1/Ti = Ri0([Fe] = 0) + ri \cdot [Fe]$.

For the in vivo study, two ROIs were drawn on one slice of the T2 sequence: one to encompass the region of hypointense signal, and one in the adjacent region without labelled macrophages ([Fe]=0). Iron concentrations were estimated as: $[Fe] = (1/T2([Fe]) - 1/T2([Fe] = 0))/r2$, where r2 is the transverse relaxivity estimated in the in vitro experiment. The cell number was then estimated as follows: (iron concentration [Fe] × injection volume (3 μL) × molar mass of iron (56 g/mol)/mean iron load per cell measured by ICP-AES (0.45 pg/cell).

Iron quantification by ICP-AES

The iron concentration in each tube was measured after the last MRI by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES), using an axial Jobin-Yvon 138 Ultrace prototype spectrometer operating at 1,075 W and

equipped with a Meinhard-type nebuliser and Scott spray chamber. Free ferumoxtran-10 and AMNP samples were directly analysed after suitable dilution. Cell samples were digested in a closed Ethos Touch Control microwave device from Milestone. Before use, the vessel was cleaned by addition of 5 mL 65% HNO₃ (Fluka) and 3 mL ultrapure water and heated to 180°C for 15 min. Each sample was placed in a 50-mL Teflon digester. Then 5 mL 65% HNO₃, 2 mL 30% H₂O₂ (Trace Select, from Fluka) and 1 mL ultrapure water were added. The digester was closed, progressively heated to 180°C in the microwave (15 min) and then maintained at 180°C for 30 min. Blanks were performed to check the absence of reagent pollution. After cooling, mineralised samples were diluted to 18 mL. Flow rates were plasma gas=12 L min⁻¹, nebuliser gas=0.7 L min⁻¹ and auxiliary gas=0.15 L min⁻¹. Integration time was set at 2 s and wavelength at 238.2 nm.

Results

Cell iron uptake

Prussian blue staining showed visually lower ferumoxtran-10 uptake by BM-derived macrophages compared with AMNP (Fig. 1). This was confirmed by ICP-EAS, with an average iron load per cell of 0.45 pg for ferumoxtran-10 and of 7.9 pg for AMNP. Iron concentrations measured by ICP-AES are given in Table 1.

In vitro MRI experiments

Qualitative analysis

T2-weighted images showed that signal loss increased with iron concentration, for both contrast agents at both fields. T1-weighted images showed that signal enhancement increased with iron concentration, for both contrast agents at both fields. For a given concentration, T2-weighted spin-echo images showed lower signal intensities for freely dispersed iron than for USPIO compartmentalised in cells

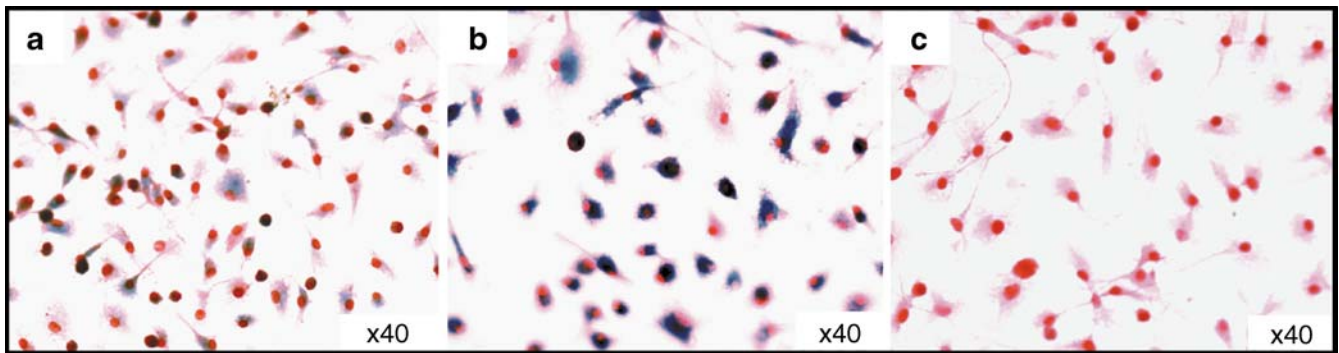


Fig. 1 Prussian blue staining of bone-marrow-derived macrophages **a** labelled with USPIO, **b** labelled with AMNP and **c** without contrast agent

(Fig. 2a). Likewise, T2*-weighted images showed greater signal loss for iron-labelled macrophages than for free iron (Fig. 2c). T1-weighted gradient-echo images showed a signal enhancement for free USPIOs and a signal loss for compartmentalised USPIOs (Fig. 2b).

Quantitative analysis

There was a linear relationship between iron concentration and relaxivity changes in all cases for the present concentration ranges. No T1, T2 or T2* changes were observed in agarose phantoms containing an increasing number of unlabelled control cells. Quantitative analysis results for ferumoxtran-10 and AMNP are presented in Table 3. Intracellular compartmentalisation of ferumoxtran-10 and AMNP drastically reduced T1 relaxivity at both fields (Fig. 3). Intracellular compartmentalisation of ferumoxtran-10 decreased T2 relaxivity and increased T2* relaxivity at both fields (Fig. 4). The same result was observed for AMNP, although with different magnitudes (Fig. 5).

In vivo MRI experiment

Qualitative analysis

At the iron-labelled macrophage injection site, T2-, T2*- and gradient-echo T1-weighted images showed a hypoin-

tense signal (Fig. 6b and c, arrowhead). These effects were iron- rather than cell-dependent, as unlabelled cells did not produce any signal. At the free USPIO injection site, T2-weighted images showed a rapidly spreading hypointense signal (Fig. 6b, circled). In one animal, this hypointense signal spread along the corpus callosum (Fig. 6b, arrows). However, no signal abnormalities were detected on T2*-weighted and T1-weighted gradient-echo images in the corpus callosum or at the free USPIO injection site.

Quantitative analysis

Quantitative analysis was performed in the hemisphere containing iron-labelled cells only, as the spread of free iron oxide nanoparticles prevented ROIs being accurately drawn in the other hemisphere. Table 2 presents the iron concentrations and cell numbers estimated from R2 measurements. There was fair overall agreement between theoretical and estimated values.

Discussion

In the present study, the relaxation properties resulting from cell internalisation of two types of USPIOs, ferumoxtran-10 and AMNP, were quantitatively evaluated at 4.7 T and 7 T. A linear relationship was observed between R1, R2 and R2* values and iron concentration in

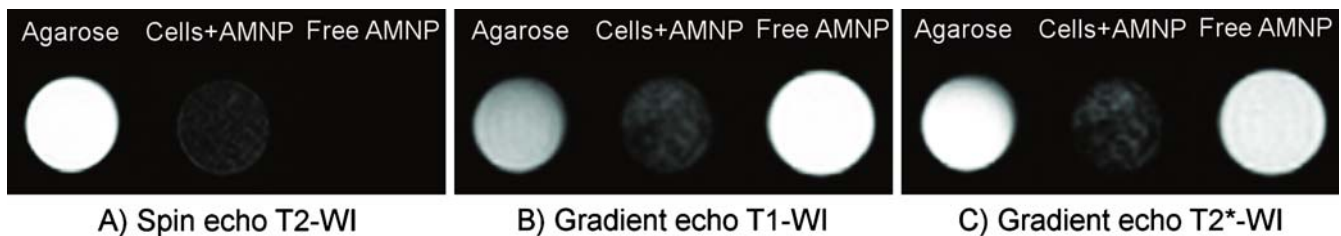


Fig. 2 Multi-contrast MRI of agarose gel without contrast agent (*left-hand tube*), NPMA-labelled macrophages (*middle tube*) with an iron concentration of 0.36 mM (as measured afterwards by ICP-AES) and free NPMA (*right-hand tube*) with an iron concentration of

0.31 mM (as measured afterwards by ICP-AES) at 7 T: **a** T2-weighted spin-echo, TE/TR 75/3,000 ms; **b** T1-weighted gradient-echo, TE/TR 3.6/161 ms, flip angle 50°; **c** T2*-weighted gradient-echo, TE/TR 5.4/468 ms, flip angle 20°

Table 3 T1, T2 and T2* relaxivity values (r_1 , r_2 and r_2^*) in agarose 0.75% w/w solution for ferumoxtran-10 and AMNP freely dispersed and compartmentalised in macrophages at 4.7 T and 7 T

Relaxivity ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Iron distribution	4.7 T	7 T
Ferumoxtran-10			
r_1	Free	2.8	1.4
	Labelled macrophages	0.1	0.1
r_2	Free	118	117
	Labelled macrophages	79	64
r_2^*	Free	163	165
	Labelled macrophages	534	635
AMNP			
r_1	Free	6.1	2.9
	Labelled macrophages	0.2	0.0
r_2	Free	261	191
	Labelled macrophages	44	35
r_2^*	Free	257	349
	Labelled macrophages	257	450

in vitro at 4.7 T and at 7 T, for concentrations up to 0.036 mM. The T1 relaxivity of freely dispersed ferumoxtran-10 decreased substantially between 4.7 T and 7 T, while T2 relaxivity decreased moderately, in agreement with NMRD profiles [8]. The same was true for freely dispersed AMNP, although the changes were more pronounced. At a given field, the T1 and T2 relaxivities (r_1 and r_2) of both USPIO

and AMNP decreased following macrophage internalisation. The T2* relaxivities of USPIO-labelled macrophages (r_2^*) were enhanced compared with T2 relaxivities (r_2). These observations are in line with results obtained at 1.5 T and 3 T [9, 23–26].

Qualitative analysis

The T1-weighted gradient-echo sequence described here proved to be a simple but efficient tool to produce signal enhancement for free iron and signal loss for iron-labelled cells. This sequence was initially proposed for monitoring ferumoxtran-10 brain uptake in a model of focal cerebral ischaemia [1, 4]. In these studies, a hyperintense signal was observed in the corpus callosum of injured animals 1 day after surgery. The authors hypothesised that this hyperintensity was caused by the interaction of surrounding protons with interstitial ferumoxtran-10. The same region appeared hypointense 2 days later, which was attributed to susceptibility effects caused by ferumoxtran-10 cell internalisation [1]. Interestingly, the same spread of T2 hypointense signal along the corpus callosum as in the above experimental studies was observed in our stereotaxic injection experiments. This probably corresponded to the passive diffusion of free ferumoxtran-10 along white matter fibres, as cells are not known to migrate in the absence of stimulus [27]. However, corresponding gradient-echo T1-weighted images showed only the susceptibility effects of iron-labelled cells and failed to demonstrate T1

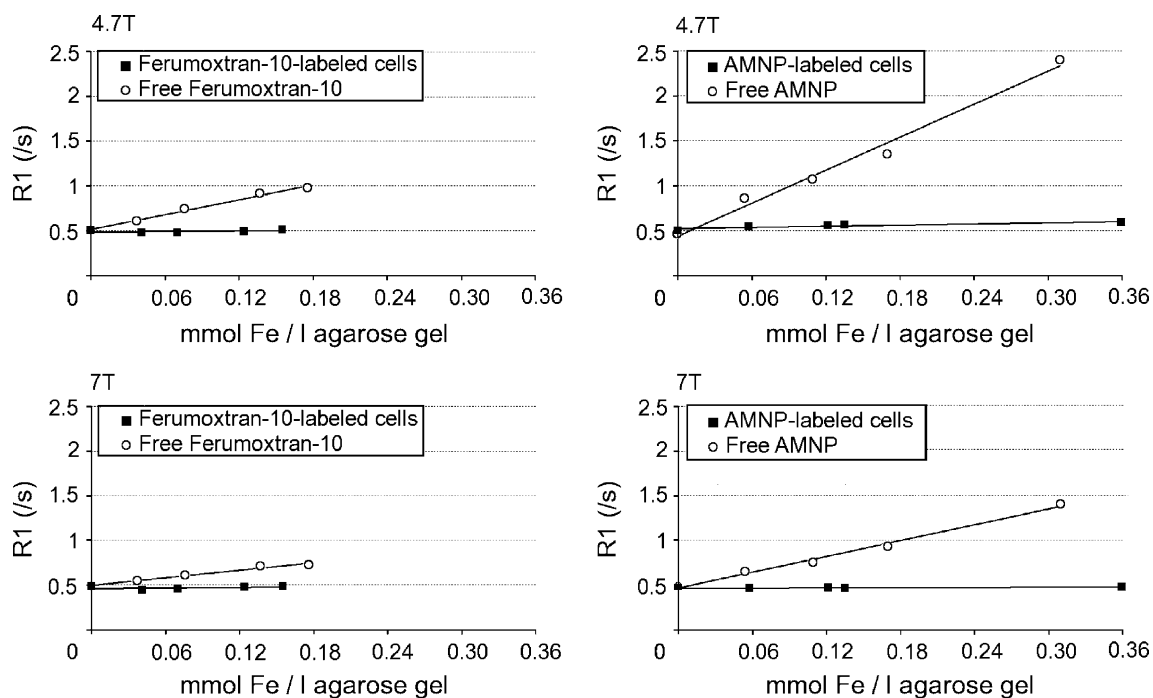


Fig. 3 Dependence of R1 on iron concentration in phantoms containing free and cell-labelled ferumoxtran-10 (left) or free and cell-labelled AMNP (right), at 4.7 T (top) and 7 T (bottom)

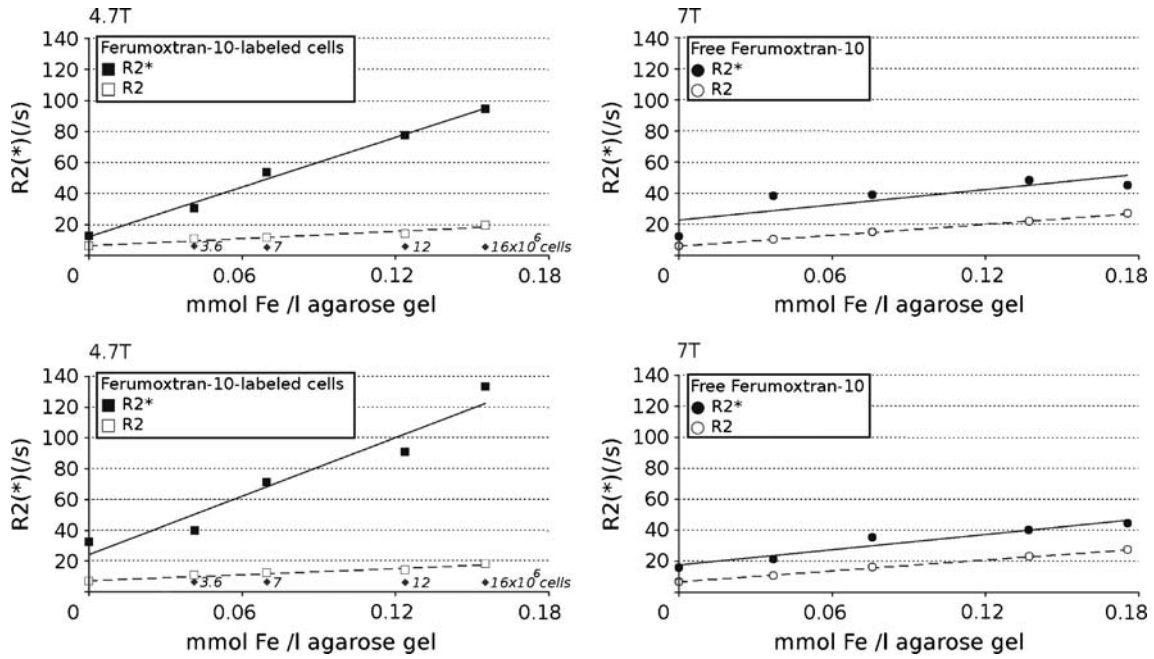


Fig. 4 Dependence of R2* (solid line) and R2 (dashed line) on iron concentration in phantoms containing free (right) and cell-labelled (left) ferumoxtran-10, at 4.7 T (top) and 7 T (bottom). Diamonds represent R2 of control unlabelled cells

enhancement in the corpus callosum, which was isointense compared with the adjacent brain. This discrepancy might be a result of a difference in iron concentration (dilution effect) and/or in bulk water environment. The presence of oedematous fluid in the corpus callosum of injured mice [4] probably played a role in T1 enhancement by increasing the density of surrounding protons. Nevertheless, it is important to note that, despite the high concentration of

iron initially injected, free USPIOs did not produce any signal change in healthy brain using this sequence.

Quantitative analysis

Quantitative estimation of iron oxide load is highly desirable in cellular MRI studies, as it would allow the

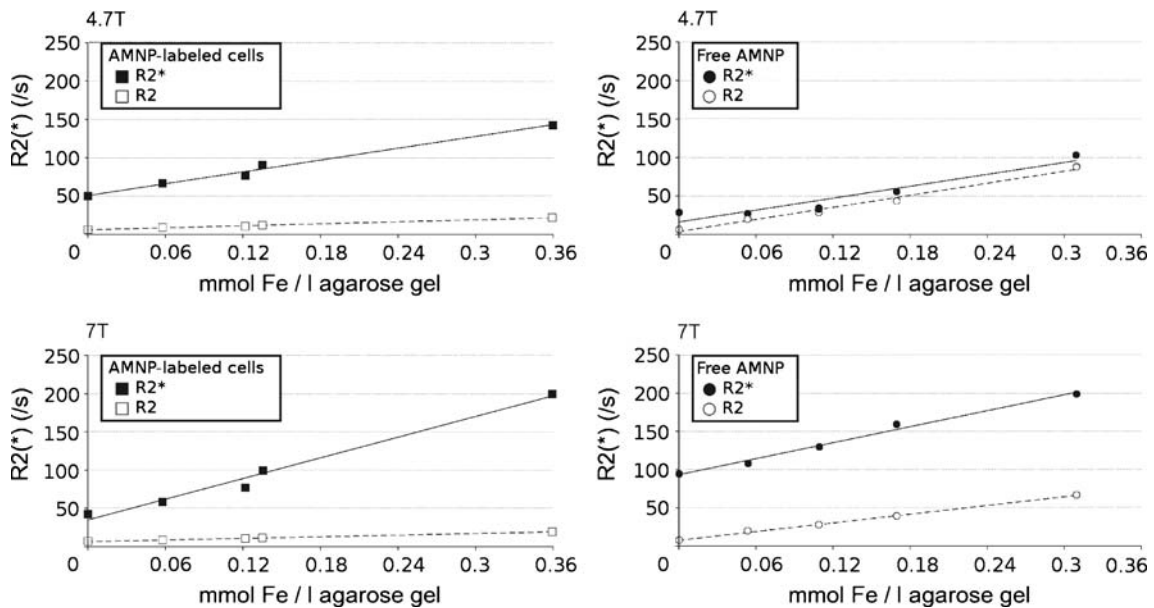
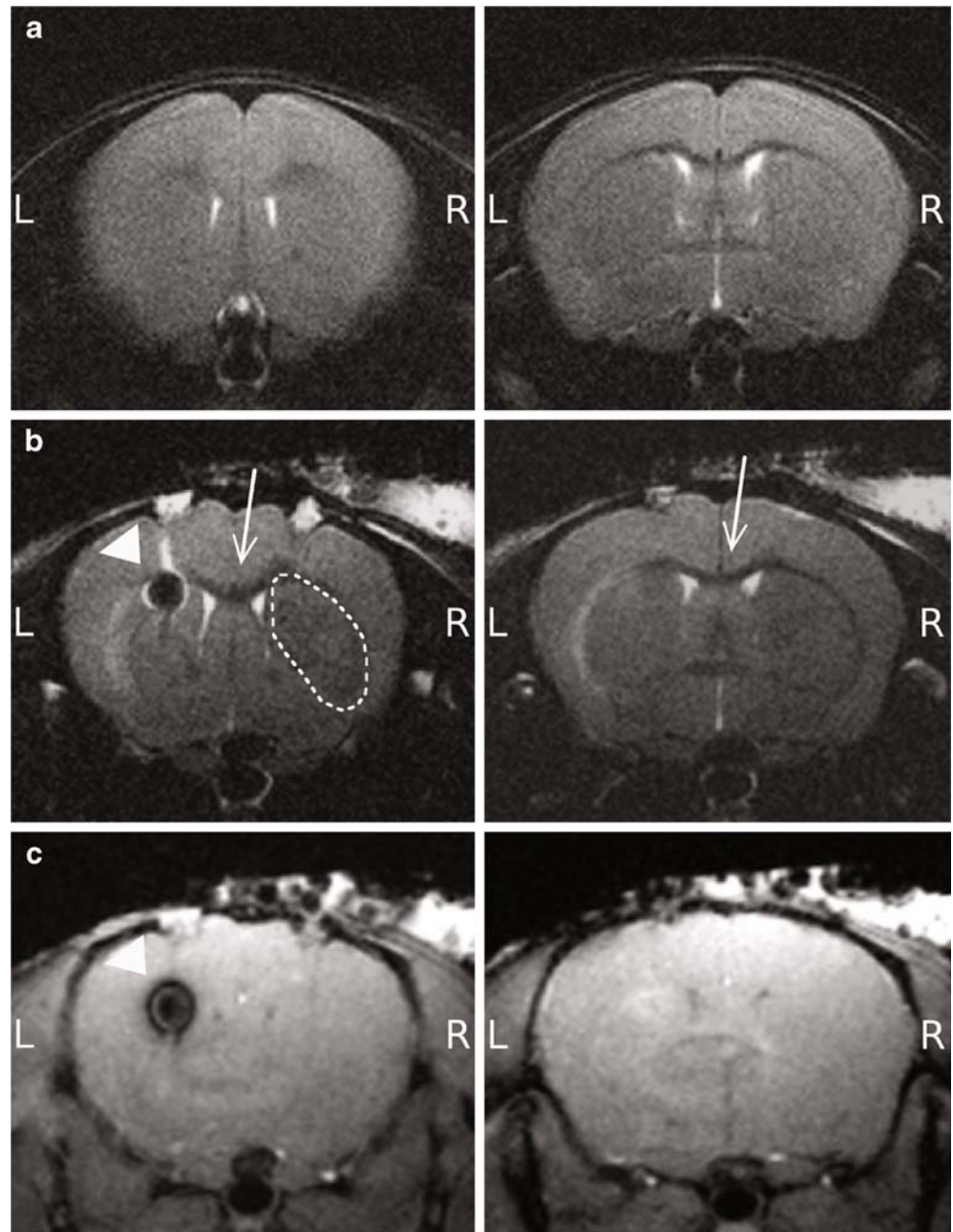


Fig. 5 Dependence of R2* (solid line) and R2 (dashed line) on iron concentration in phantoms containing free (right) and cell-labelled (left) AMNP, at 4.7 T (top) and 7 T (bottom)

Fig. 6 Two consecutive axial slices (*left* bregma 1 mm and *right* bregma 0 mm, according to Franklin and Paxinos' atlas) of stereotaxically injected mice. **a** T2-weighted images (TE/TR 75/3,000 ms) of control mouse injected with saline in the right hemisphere and unlabelled cells in the left hemisphere. **b** T2-weighted images (TE/TR 75/3,000 ms) of mouse injected with free ferumoxtran at an iron concentration of 0.32 mM in the right hemisphere and ferumoxtran-labelled cells with the same iron concentration in the left hemisphere (*arrowhead*). Note the dispersion of the hypointense signal on the side where free ferumoxtran-10 was injected (*dashed line*, ROI), and the spread of the hypointense signal along the corpus callosum (*arrows*), probably corresponding to the passive diffusion of free iron oxides nanoparticles. **c** T1-weighted gradient-echo images (TE/TR 3.6/161 ms, flip angle 50°) of the same mouse as in **b**. Note the signal loss induced by cells (*arrowhead*), and the absence of signal change in the corpus callosum part that shows a decreased T2 (*arrows* in **b**). *L* left, *R* right



amount of iron-labelled cells to be monitored and, potentially, the effects of anti-inflammation therapy to be assessed. There are two main conditions for the *in vitro* calibration curves to be useful for *in vivo* studies. First, they should accurately reflect the *in vivo* calibration curves; and second, free and compartmentalised USPIOs should be able to be differentiated, in order to use the appropriate calibration curve. This is especially true when the contrast agent is administered intravenously, as with ferumoxtran-10, but also to a lesser extent when macrophages are labelled *ex vivo*, as the contrast agent (represented in the current study by AMNP) may later be

released from lysed cells *in vivo*. One should keep in mind that imaging in tubes is fundamentally different from imaging in mice, especially if T1, T2 and T2* properties are to be quantified. Correlation time τ_c and diffusion time τ_d depend on the proton microenvironment (iron distribution, cell water content, surrounding macromolecules, etc.), which is difficult to reproduce *in vitro*. However, phantom investigations are still of interest as they enable quantitative estimation under tightly controlled conditions, and assessment of the effect of parameters such as iron concentration, internalisation or type of iron nanoparticles.

The *in vitro* experiments were designed to represent the *in vivo* situation as accurately as possible: (1) macrophages derived from bone-marrow cultures were chosen because they represent the main phagocytic cells involved in the case of intravenous administration; (2) labelling conditions for ferumoxtran-10 (concentration, incubation time) were defined to match the order of magnitude of mouse plasma concentrations and the prolonged vascular remanence for the high experimental dose of 2 mmol Fe/kg [1]; (3) MR sequences used the same parameters as in *in vivo* studies [1], apart from the field of view and matrix size; and (4) cell samples were prepared in agarose gel without any fixation procedure, in order to maintain most relaxation mechanisms encountered *in vivo* (samples being imaged immediately after preparation). There are limitations to this approach. Contrary to ferumoxtran-10 uptake, AMNP uptake saturates as incubation time and/or extracellular concentration increases [13]. The AMNP labelling protocol was therefore designed to reach the optimal iron load for the particular cells under study. As expected [13, 28], the iron load per cell was much higher (17-fold) with AMNP than with ferumoxtran-10. Because of the huge number of cells needed to prepare ferumoxtran-10 tubes, the range of concentrations explored was smaller for ferumoxtran-10 than for AMNP (0–0.24 vs 0–0.36 mM). The range of concentrations actually studied was further reduced for ferumoxtran-10 (0–0.15 mM), probably because of uncertainties on cell counts and pipetting. In addition, the downside of working with unfixed cells is that iron may be released into the agarose in the case of cell death occurring during the experiment. However, the large difference between $R2^*$ and $R2$ observed for USPIO-labelled macrophage samples suggests that a substantial fraction of iron was indeed compartmentalised inside the cells throughout the experiment [24]. In this study, cell proliferation and division (which would decrease the iron load per cell) was not an issue, because studied macrophages were non-proliferating cells.

The other major differences between the *in vitro* and the *in vivo* study were in temperature and iron distribution volumes. The tube study involved free dispersion of cells/contrast agent in the agarose gel, whereas in the mouse study they were concentrated in a volume that was 100 times smaller. Transverse relaxivity appears to be quite sensitive to the iron distribution size scale [29], and differences in distribution volume may thus alter the calibration curves. One way to overcome this would be to work with phantoms of cells/USPIO inclusions in a homogeneous agar block, as, for example, in [30, 31]. However, while such phantoms are well suited to investigating MRI detection limits, they are much more difficult to prepare and to analyse quantitatively than dispersion phantoms. Despite these limitations, the fairly good match between theoretical and estimated iron loads and cell counts obtained in the *in vivo* experiment supports the validity of the present *in vitro* calibration curves for *in*

vivo investigation. These observations encourage further *in vivo* studies, involving a broader range of cell numbers, in order to confirm these results. However, it was not possible to compare free and compartmentalised USPIOs *in vivo*, because dilution of free USPIOs prevented comparison of equal amounts of iron. This dilution effect further underlines the difficulty of designing an *in vivo* experiment to characterise contrast agents in their “natural” environment.

Internalisation of USPIO resulted in a $T2^*$ decrease because of the strong magnetic susceptibility effects induced by compartmentalisation. There was an exception, however, in one experiment, where the $r2^*$ of AMNP-labelled cells was found to be of the same order of magnitude than that of free AMNP (at 4.7 T). This discrepancy might be explained by the fact that $T2^*$ is more difficult to quantify than $T1$ and $T2$, because of image artefacts (e.g. micro-bubbles of air in the sample), and thus $r2^*$ values are less accurate than $r1$ and $r2$. However, the effect of compartmentalisation was clear when comparing $r2^*/r2$ ratios: at 4.7 T, for example, there was a fivefold increase in this ratio between free and compartmentalised ferumoxtran-10 and a sixfold increase between free and compartmentalised AMNP.

Though both ferumoxtran-10 and AMNP showed a decrease in $r1$ and $r2$ and an increase in $r2^*$ following cell internalisation, they differed in the amount by which these changes occurred. These differences might be attributed to differences in the intracellular distribution of the iron oxide nanoparticles on the microscopic scale. Ferumoxtran-10, on the one hand, is a dextran-coated USPIO internalised in macrophages by means of fluid phase endocytosis [20]. It has been widely used as an intravenously injected USPIO subsequently taken up by mononuclear phagocytic cells *in vivo* [14]. AMNP, on the other hand, represents a new class of dextran-free USPIO coated with charged monomers. The negative surface charge allows efficient endocytosis via electrostatic interaction with the cell membrane [13], making it suitable for *ex vivo* magnetic labelling. It is likely that the difference in cellular uptake mechanism resulted in different intracellular clustering/compartmentalisation, which in turn caused differences in microscopic field inhomogeneities and in changes in MR relaxation time constants.

Conclusion

Quantitative monitoring of iron-labelled cells is a challenging but necessary objective if cellular MRI techniques are to gain wide acceptance in preclinical and clinical applications. The effect of iron oxide nanoparticles on tissue relaxation times (and thus on MRI contrast) is complex. Therefore, carefully controlled *in vitro* studies, despite their evident limitations, are mandatory to help in interpreting MR signal

intensities in terms of iron compartmentalisation and concentration. Future work should focus on demonstrating the validity of such calibration curves for experimental MRI cell tracking.

Acknowledgements This work was supported by the grant from the ANR TecSan (INFLAM).

References

1. Wiart M, Davoust N, Pialat JB, Desestret V, Moucharaffie S, Cho TH, Mutin M, Langlois JB, Beuf O, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezene Y (2007) MRI monitoring of neuroinflammation in mouse focal ischemia. *Stroke* 38:131–137
2. Nighoghossian N, Wiart M, Cakmak S, Berthezene Y, Derex L, Cho TH, Nemoz C, Chapuis F, Tisserand GL, Pialat JB, Trouillas P, Froment JC, Hermier M (2007) Inflammatory response after ischemic stroke: a USPIO-enhanced MRI study in patients. *Stroke* 38:303–307
3. Vellinga MM, Oude Engberink RD, Seewann A, Pouwels PJ, Wattjes MP, van der Pol SM, Pering C, Polman CH, de Vries HE, Geurts JJ, Barkhof F (2008) Pluriformity of inflammation in multiple sclerosis shown by ultra-small iron oxide particle enhancement. *Brain* 131:800–807
4. Desestret V, Brisset JC, Moucharaffie S, Devillard E, Nataf S, Honnorat J, Nighoghossian N, Berthezene Y, Wiart M (2009) Early-stage investigations of ultrasmall superparamagnetic iron oxide-induced signal change after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Stroke* 40:1834–1841
5. Billotey C, Aspod C, Beuf O, Piaggio E, Gazeau F, Janier MF, Thivolet C (2005) T-cell homing to the pancreas in autoimmune mouse models of diabetes: in vivo MR imaging. *Radiology* 236:579–587
6. Lee JS, Kang HJ, Gong G, Jung HD, Lim KH, Kim ST, Lim TH (2006) MR imaging of in vivo recruitment of iron oxide-labeled macrophages in experimentally induced soft-tissue infection in mice. *Radiology* 241:142–148
7. Bourrinet P, Bengel HH, Bonnemain B, Dencausse A, Idee JM, Jacobs PM, Lewis JM (2006) Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Invest Radiol* 41:313–324
8. Corot C, Robert P, Idee JM, Port M (2006) Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 58:1471–1504
9. Billotey C, Wilhelm C, Devaud M, Bacri JC, Bittoun J, Gazeau F (2003) Cell internalization of anionic maghemite nanoparticles: quantitative effect on magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 49:646–654
10. Luciani A, Parouchev A, Smirnov P, Braga G, Wilhelm C, Gazeau F, Boudechiche L, L'Hermine-Coulomb A, Dagher I, Franco D, Rahmouni A, Hadchouel M, Weber A, Clement O (2008) In vivo imaging of transplanted hepatocytes with a 1.5-T clinical MRI system—initial experience in mice. *Eur Radiol* 18:59–69
11. Riviere C, Boudghene FP, Gazeau F, Roger J, Pons JN, Laissy JP, Allaire E, Michel JB, Letourneur D, Deux JF (2005) Iron oxide nanoparticle-labeled rat smooth muscle cells: cardiac MR imaging for cell graft monitoring and quantitation. *Radiology* 235:959–967
12. Smirnov P, Gazeau F, Lewin M, Bacri JC, Siauve N, Vayssettes C, Cuenod CA, Clement O (2004) In vivo cellular imaging of magnetically labeled hybridomas in the spleen with a 1.5-T clinical MRI system. *Magn Reson Med* 52:73–79
13. Wilhelm C, Gazeau F (2008) Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 29:3161–3174
14. Corot C, Petry KG, Trivedi R, Saleh A, Jonkmanns C, Le Bas JF, Blezer E, Rausch M, Brochet B, Foster-Gareau P, Baleriaux D, Gaillard S, Dousset V (2004) Macrophage imaging in central nervous system and in carotid atherosclerotic plaque using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* 39:619–625
15. Wei L, Zhou G, Li Z, He L, Gao M, Tan J, Lei H (2007) Detection of toxoplasmic lesions in mouse brain by USPIO-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 25:1442–1448
16. Peters AM, Brookes MJ, Hoogenraad FG, Gowland PA, Francis ST, Morris PG, Bowtell R (2007) T2* measurements in human brain at 1.5, 3 and 7 T. *Magn Reson Imaging* 25:748–753
17. Theysohn JM, Maderwald S, Kraff O, Moeninghoff C, Ladd ME, Ladd SC (2008) Subjective acceptance of 7 Tesla MRI for human imaging. *Magma* 21:63–72
18. Dousset V, Brochet B, Deloire MS, Lagoarde L, Barroso B, Caille JM, Petry KG (2006) MR imaging of relapsing multiple sclerosis patients using ultra-small-particle iron oxide and compared with gadolinium. *AJNR Am J Neuroradiol* 27:1000–1005
19. Saleh A, Schroeter M, Ringelstein A, Hartung HP, Siebler M, Modder U, Jander S (2007) Iron oxide particle-enhanced MRI suggests variability of brain inflammation at early stages after ischemic stroke. *Stroke* 38:2733–2737
20. Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri JC, Gazeau F (2003) Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* 24:1001–1011
21. Metz S, Bonaterre G, Rudelius M, Settles M, Rummeny EJ, Daldrup-Link HE (2004) Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro. *Eur Radiol* 14:1851–1858
22. Muller K, Skepper JN, Posfai M, Trivedi R, Howarth S, Corot C, Lancelot E, Thompson PW, Brown AP, Gillard JH (2007) Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro. *Biomaterials* 28:1629–1642
23. Brilllet PY, Gazeau F, Luciani A, Bessoud B, Cuenod CA, Siauve N, Pons JN, Poupon J, Clement O (2005) Evaluation of tumoral enhancement by superparamagnetic iron oxide particles: comparative studies with ferumoxtran and anionic iron oxide nanoparticles. *Eur Radiol* 15:1369–1377
24. Kuhlper R, Dahnke H, Matuszewski L, Persigehl T, von Wallbrunn A, Allkemper T, Heindel WL, Schaeffter T, Bremer C (2007) R2 and R2* mapping for sensing cell-bound superparamagnetic nanoparticles: in vitro and murine in vivo testing. *Radiology* 245:449–457
25. Simon GH, von Vopelius-Feldt J, Wendland MF, Fu Y, Piontek G, Schlegel J, Chen MH, Daldrup-Link HE (2006) MRI of arthritis: comparison of ultrasmall superparamagnetic iron oxide vs. Gd-DTPA. *J Magn Reson Imaging* 23:720–727

-
26. Simon GH, Bauer H, Saborovski O, Fu YJ, Corot C, Wendland MF, Daldrup-Link HE (2006) T1 and T2 relaxivity of intracellular and extracellular USPIO at 1.5T and 3T clinical MR scanning. *Eur Radiol* 16(3):738–745
 27. Hoehn M, Kustermann E, Blunk J, Wiedermann D, Trapp T, Wecker S, Focking M, Arnold H, Hescheler J, Fleischmann BK, Schwandt W, Buhrle C (2002) Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16267–16272
 28. Raynal I, Prigent P, Peyramaure S, Najid A, Rebuzzi C, Corot C (2004) Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. *Invest Radiol* 39:56–63
 29. Wood JC, Fassler JD, Meade T (2004) Mimicking liver iron overload using liposomal ferritin preparations. *Magn Reson Med* 51:607–611
 30. Fleige G, Seeberger F, Laux D, Kresse M, Taupitz M, Pilgrimm H, Zimmer C (2002) In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking. *Invest Radiol* 37:482–488
 31. Schafer R, Kehlbach R, Wiskirchen J, Bantleon R, Pintaske J, Brehm BR, Gerber A, Wolburg H, Claussen CD, Northoff H (2007) Transferrin receptor upregulation: in vitro labeling of rat mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide. *Radiology* 244:514–523

RESUME en français

La réaction inflammatoire post-ischémique est dominée par les cellules mononuclées phagocytaires : la microglie, cellules immunocompétentes du parenchyme cérébral, et les macrophages dérivant du sang et infiltrant le tissu cérébral lésé. L'imagerie cellulaire par IRM avec injection de nanoparticules superparamagnétiques d'oxydes de fer (USPIO) a contribué à la description dynamique de cette infiltration macrophagique tardive. Cependant, la séquence spatio-temporelle de l'activation microgliale et du recrutement macrophagique, intriqués avec des altérations de la barrière hémato-encéphalique au cours des premières heures post-ischémie, reste mal élucidée. Nous avons tenté de mieux comprendre la relation entre les signaux IRM après injection d'USPIO et la réaction phagocytaire aux temps précoces post-ischémie dans un modèle d'accident vasculaire cérébral chez la souris. Nos résultats suggèrent que les modifications précoces de signal après injection d'USPIO reflètent principalement des mécanismes non spécifiques d'entrée des particules dans le tissu lésé. Pour étudier les interactions entre les cellules neurales et les macrophages périphériques au cours de la réaction inflammatoire post-ischémique précoce, nous avons développé un modèle *in vivo* d'ischémie globale chez la souris et un modèle *in vitro* d'hypoxie sur cultures organotypiques d'hippocampe. Ce dernier modèle nous a permis d'analyser les effets de co-cultures macrophagiques sur la survie des cellules neurales au sein du parenchyme cérébral ischémié et d'analyser les profils d'expressions cytokiniques impliqués dans ces interactions à médiation humorale. Nous avons observé un effet neuroprotecteur sur la perte neurale post-hypoxique des co-cultures macrophagiques. Cet effet à médiation humorale est associé à un profil d'activation macrophagique de type alternatif (M2).

TITRE en anglais

Early phagocytic response in experimental ischemia in mice : MRI and histology study

RESUME en anglais

Clinical outcome in cerebral ischemia may be influenced by innate immune cells of myeloid lineage: central nervous system (CNS)-infiltrating peripheral macrophages and CNS-resident microglia. Noninvasive monitoring of these cells may improve the understanding of postischemic inflammation. Accumulation of Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide (USPIO) has been observed in infarcted areas at the subacute stage of experimental stroke. However, the exact route of USPIO uptake and early brain distribution remain elusive, hampering the interpretation of USPIO-related signals. Therefore, we compared MRI signal changes after intravenous USPIO injection with the histological distribution of iron particles and macrophagic cells 6 to 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. Our results suggest that in this model, early USPIO-related MR signal changes are mainly related to passive diffusion of free USPIO through a damaged blood-brain barrier and to intravascular trapping rather than peripheral phagocyte infiltration. To understand the complex interactions between microglia, hypoxic neurons and CNS-infiltrating macrophages, we set up an *in vitro* model where primary macrophages were co-cultured with hippocampal slices submitted to hypoxia and glucose deprivation (OGD). Our results indicate that under these experimental conditions, cultured macrophages engage in a M2 activation pattern and afford partial protection from OGD-induced neuronal loss through paracrine mechanisms. We also conclude that microglia is susceptible to hypoxia-induced cell death *in vitro* and *in vivo*.

DISCIPLINE

Neurosciences

MOTS-CLES

Ischémie cérébrale, inflammation, macrophages, microglie, IRM, USPIO, histopathologie

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Neuro-oncologie et Neuro-inflammation UMR-S 842 Inserm Unité 842.
Faculté Laennec rue Guillaume Paradin 69372 Lyon cedex 08