



HAL
open science

**ELEMENTS DE CARACTERISATION DE LA
MICROVASCULARISATION CEREBRALE PAR
DIFFERENTES METHODES D'IMAGERIE.
Application à l'étude d'un modèle d'ischémie focale
transitoire chez le rat.**

Emmanuelle Gachenot - Grillon

► **To cite this version:**

Emmanuelle Gachenot - Grillon. ELEMENTS DE CARACTERISATION DE LA MICROVASCULARISATION CEREBRALE PAR DIFFERENTES METHODES D'IMAGERIE. Application à l'étude d'un modèle d'ischémie focale transitoire chez le rat.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00133546

HAL Id: tel-00133546

<https://theses.hal.science/tel-00133546>

Submitted on 26 Feb 2007

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

Ecole doctorale Ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement

DOCTORAT

Bio-technologie, santé et management

Emmanuelle GACHENOT – GRILLON

ELEMENTS DE CARACTERISATION DE LA MICROVASCULARISATION CEREBRALE PAR DIFFERENTES METHODES D'IMAGERIE.

Application à l'étude d'un modèle d'ischémie focale transitoire chez le rat.

Thèse dirigée par Chantal REMY

Soutenue le 15 décembre 2006

Composition du jury

Président : M. Marc HOMMEL, Professeur, Praticien hospitalier
Rapporteurs : M. Simon ROUSSEL, Maître de Conférences
M. Nicolas BRUDER, Professeur, Praticien hospitalier
Examineurs : M^e Astrid NEHLIG, Directrice de Recherche
M^e Chantal REMY, Directrice de Recherche
M. Emmanuel BARBIER, Chargé de Recherche

Thèse préparée au sein de l'unité mixte INSERM / UJF 594

Neuroimagerie fonctionnelle et métabolique

Centre Hospitalier Universitaire - Pavillon B – GRENOBLE

Merci..

A Chantal REMY et Emmanuel BARBIER, pour m'avoir encadrée et guidée durant toutes ces années, pour leurs compétences, leur patience et leur gentillesse.

A Michel DECOPRS qui fut l'initiateur de ce projet de thèse, pour son accueil enthousiaste à mon arrivée à l'U438 et ses encouragements.

A Christoph SEGBARTH, qui m'a permis de poursuivre sereinement mon travail dans l'U594.

Aux membres du jury, qui ont accepté d'examiner et juger mon travail.

A tous mes collègues de travail que j'ai un jour croisés dans l'U438 et l'U594 et à tous ceux que je continuerai de côtoyer dans l'U836. Merci pour leur aide, leur soutien et leur amitié.

Table des matières.

Table des matières.....	5
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	15
Introduction générale.....	17
Chapitre 1 : Données cliniques et physiopathologiques sur l'ischémie cérébrale.....	21
1.1. Données cliniques sur l'ischémie cérébrale.....	22
1.1.1. Définition et classification.....	22
1.1.2. Vascularisation cérébrale et topographie des accidents ischémiques cérébraux.....	22
1.1.3. Données épidémiologiques.....	25
1.1.3.1. Mortalité.....	25
1.1.3.2. Incidence.....	26
1.1.3.3. Prévalence.....	27
1.1.3.4. Placement en centres de soins de longue durée.....	27
1.1.4. Etiologies.....	27
1.1.5. Facteurs de risque et prévention.....	28
1.1.6. Diagnostic des accidents ischémiques cérébraux.....	29
1.1.7. Traitement de l'accident ischémique cérébral.....	33
1.2. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale.....	36
1.2.1. DSC et métabolisme énergétique.....	37
1.2.2. Seuils de viabilité ischémique.....	38
1.2.3. Le concept de cœur et pénombre ischémique.....	39
1.2.4. Les mécanismes moléculaires des dommages ischémiques.....	40
1.2.4.1. L'hypothèse excitotoxique.....	40
1.2.4.2. Formation de radicaux libres.....	41
1.2.4.3. L'acidose lactique.....	42
1.2.4.4. La formation d'œdèmes.....	42
1.2.4.5. Autres évènements physiopathologiques.....	43
1.2.4.6. La mort cellulaire.....	44
Chapitre 2 : Modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale.....	47
2.1. Modèles d'ischémie cérébrale.....	48
2.1.1. Ischémie globale transitoire.....	48
2.1.1.1. Arrêt cardiaque.....	48
2.1.1.2. Ischémie cérébrale complète.....	49
2.1.1.3. Ischémie cérébrale incomplète.....	49
2.1.1.4. Modèle d'ischémie in vitro.....	50
2.1.2. Micro-embolisme.....	50
2.1.3. Ischémie focale transitoire ou permanente.....	51

2.1.3.1. Craniectomie et électrocoagulation de l'ACM.	51
2.1.3.2. Occlusion photothrombotique.....	51
2.1.3.3. Modèle auto-embolique.....	51
2.1.3.4. Injection intracérébrale d'endothéline.	52
2.1.3.5. Occlusions vasculaires extracrâniennes.....	52
2.1.3.6. Occlusion intraluminale de l'ACM.....	52
2.1.4. Modèle d'ischémie cérébrale <i>in-silico</i>	54
2.2. Choix et mise au point du modèle d'ischémie pour les études de cette thèse.....	54
2.2.1. Confection du filament occlusif.....	55
2.2.2. Calibration du diamètre des filaments.....	57
2.2.3. Procédure opératoire détaillée.....	59
2.2.4. Reperfusion.....	61
Chapitre 3 : Etude de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique au cours de l'ischémie cérébrale transitoire chez le rat.....	63
3.1. Introduction bibliographique.....	64
3.1.1. Définition et constitution de la barrière hémato-encéphalique.....	64
3.1.2. Perméabilité de la BHE.....	66
3.1.3. Mécanismes de rupture de la BHE au cours de l'ischémie cérébrale.....	69
3.1.3.1. Stress oxydatif.....	70
3.1.3.2. Protéolyse.....	71
3.1.3.3. Processus inflammatoires.....	72
3.1.3.4. Augmentation de la pression hydrostatique.....	73
3.1.4. Chronologie d'ouverture de la BHE.....	73
3.2. Présentation et objectifs de l'étude.....	78
3.3. Matériels et méthodes.....	79
3.3.1. Modèle animal et protocole.....	79
3.3.2. Protocole d'IRM.....	80
3.3.3. Histologie.....	82
3.3.4. Traitement et analyse des données.....	83
3.3.4.1. Analyse des données IRM.....	83
3.3.4.2. Analyses statistiques.....	84
3.3.5. Mesure du contenu en eau tissulaire cérébrale au cours de l'ischémie cérébrale par gravimétrie.....	85
3.4. Résultats.....	86
3.4.1. Paramètres physiologiques.....	86
3.4.2. Observations histologiques.....	86
3.4.3. Données d'imagerie.....	90
3.4.4. Contenu tissulaire en eau.....	95
3.5. Discussion.....	96
Chapitre 4 : Evaluation de l'influence de différents anesthésiques sur le développement de l'ischémie cérébrale focale transitoire chez le rat.....	103

4.1. Introduction bibliographique : Anesthésie et neuroprotection.....	104
4.1.1. Situation du sujet.	104
4.1.2. Mécanismes d'action neuroprotecteurs des agents anesthésiques.....	110
4.1.2.1. Anesthésiques volatiles halogénés.	110
4.1.2.2. Barbituriques.	111
4.1.2.3. Propofol.	112
4.1.2.4. Conclusion.....	113
4.2. Présentation et objectifs de l'étude.	113
4.3. Matériels et méthodes.....	114
4.3.1. Modèle animal et protocole.....	114
4.3.2. Mesure du DSC par autoradiographie.....	115
4.3.2.1. Principe de la mesure.....	116
4.3.2.2. Protocole.	116
4.3.3. Coloration à l'hématoxyline-éosine.....	119
4.3.4. Traitement et analyse des données.	119
4.3.4.1. Choix des régions d'intérêt.....	119
4.3.4.2. Correction des aires.	121
4.3.4.3. Calcul des volumes d'intérêt (VOI).....	121
4.3.4.4. Calcul de la distribution des DSC par VOI.	121
4.3.4.5. Analyses statistiques.....	122
4.4. Résultats.	123
4.4.1. Paramètres physiologiques.	123
4.4.2. Données HE.....	124
4.4.2.1. Localisation des dommages ischémiques.....	124
4.4.2.2. Facteurs correctifs appliqués pour le calcul des aires des ROI.....	124
4.4.3. Données ¹⁴ C-iodoantipyrine.....	126
4.4.3.1. DSC moyen dans les différents VOI.....	126
4.5. Discussion.....	131
4.5.1. Paramètres physiologiques.	131
4.5.2. Données HE.....	134
4.5.3. Données ¹⁴ C-iodoantipyrine.....	137
4.5.4. Conclusions.	139
Chapitre 5 : Exploration non-invasive par spectrométrie proche-infrarouge des fluctuations hémodynamiques induites au cours de l'ischémie cérébrale focale transitoire chez le rat.	143
5.1. Introduction.	144
5.2. Principe de la spectroscopie proche-infrarouge (NIRS :Near InfraRed Spectroscopy).....	144
5.2. Dépistage d'une ischémie cérébrale latéralisée.	146
5.3. Imagerie de perfusion.	153
5.4. Conclusion.	164
Conclusion générale.....	167
Annexes.....	171

Liste des publications réalisées durant la thèse.	172
Bibliographie.	189
Liste des abréviations.	207

Liste des figures.

Figure 1.1 : Représentation schématique du polygone de Willis chez l'homme. D'après J.A. Mc Nulty, http://www.ann.jussieu.fr/~thiriet/csas/Glosr/Bio/Vaisseau/Artery/	23
Figure 1.2 : Représentation schématique du polygone de Willis chez le rat. D'après The Rat Nervous System ¹⁶⁵	24
Figure 1.3 : Représentation schématique des différents territoires artériels cérébraux chez l'homme. Schéma issu du site internet de la Faculté de Médecine de Brest, http://www.univ-brest.fr/S_Commune/Biblio/ANATOMIE/Web_anat/Snc/Vaisseaux/Territoires_cerveau.htm	25
Figure 1.4 : Illustration des différentes images IRM réalisées en clinique pour le diagnostic d'un AVC chez un même patient (ici, 24h après le début des signes cliniques : infarctus bien visible en T ₂ FLAIR). Images aimablement fournies par le Dr O. DETANTE, Unité Neuro-Vasculaire, Département de Neurologie du CHU de Grenoble.....	32
Figure 1.5 : Mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'ischémie cérébrale focale. D'après Dirnagl et coll ⁵⁴	36
Figure 1.6 : Effets de l'ischémie cérébrale sur le métabolisme cérébral (haut), sur l'homéostasie ionique et le contenu en eau du cortex (bas) d'après Hossmann ⁹⁶	39
Figure 1.7 : Mécanismes conduisant à la mort neuronale au décours d'une ischémie cérébrale. RO : radicaux oxygénés, IEG : gènes de réponse immédiate, d'après Hakim ⁸³	44
Figure 2.1 : Observation macroscopique d'une ischémie du territoire de l'ACM droite chez le rat après injection de Bleu d'Evans. Les flèches noires indiquent l'origine de l'ACM. Les flèches blanches délimitent le territoire ischémique. D'après Yang et coll ²³²	53
Figure 2.2: Photos montrant à gauche le dispositif servant à confectionner les filaments et à droite, un filament fini.....	56
Figure 2.3 : Schéma du filament occlusif.	56
Figure 2.4 : Examen post-mortem de la position de l'embout occlusif à la surface ventrale du cerveau. ACA : artère cérébrale antérieure ; MCA : artère cérébrale moyenne. D'après Lythgoe et coll ¹³⁸	57
Figure 2.5 : Vérification du succès de l'occlusion de l'ACM par coloration au TTC sur tissu frais. Le tissu sain est coloré en rouge tandis que la zone ischémisée reste blanche.....	59
Figure 2.6 : Représentation schématique des différentes étapes de l'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne. A Thy Sup : artère thyroïdienne supérieure ; A. Thy Occipitale : artère thyroïdienne occipitale ; ACE : artère carotide externe ; ACC : artère carotide commune ; ACI : artère carotide interne.....	60
Figure 2.7 : Représentation schématique de la technique d'occlusion intraluminale. D'après Longa et coll ¹³³ . Ant : antérieure ; Mid : moyenne ; Post : postérieure ; Int : interne ; Comm : communicante ; Sup : supérieure ; Thy : thyroïde ; Occip : occipitale ; Com : commune ; a : artère.....	61

Figure 3.1 : Différences morphologiques entre capillaires classiques et capillaires cérébraux. Image issue du site internet du club de la BHE (http://club.bhe.free.fr).	65
Figure 3.2 : Interactions des principales protéines associées aux jonctions serrées. D'après Huber et coll ¹⁰⁰ .	66
Figure 3.3 : Les différents types de transport au niveau de la BHE. (1) diffusion paracellulaire ; (2) diffusion transcellulaire ; (3) canaux cationiques ; (4) symports ioniques ; (5) antiports ioniques ; (6) diffusion facilitée ; (7) transport actif ; (8) antiport actif ; (9) endocytose (couplée à des récepteurs). D'après Huber et coll ¹⁰⁰ .	67
Figure 3.4 : Relation entre la solubilité lipidique et la capture cérébrale de quelques composés. Les valeurs de solubilités lipidiques sont ajustées en fonction des poids moléculaires (MW). En général, plus le coefficient de partage huile/eau est élevé, plus la vitesse de capture cérébrale est grande (●). Les vitesses de pénétration du phénobarbital et de la phénytoïne (anticonvulsivants) sont inférieures à celles prédites par leurs coefficients de partage car ils se lient à des protéines plasmatiques (▲). Pour le D-glucose, la L-dopa et la L-leucine (■), la vitesse de capture est plus grande que celle prédite par le coefficient de partage car ils traversent la BHE grâce à des transporteurs spécifiques. Issu de Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects ¹⁹⁶ .	68
Figure 3.5 : Mécanismes physiopathologiques menant à la formation de l'œdème cytotoxique et vasogénique. D'après Gasche et coll ⁷⁵ .	70
Figure 3.6 : Protocole expérimental montrant le statut de l'animal et le type de données IRM acquises en fonction du temps (schématique, pas à l'échelle).	81
Figure 3.7 : Positionnement de la grille sur une coupe de cerveau colorée à l'HE.	83
Figure 3.8 : Images T ₁ W obtenues pour chaque rat à la fin de l'expérience (49 min après la reperfusion).	87
après l'injection des deux agents de contraste.	87
Figure 3.9 : Observation histologique des dommages tissulaires induits par l'ischémie par coloration à l'hématoxyline-éosine.	88
Figure 3.10 : Immunomarquages du collagène IV et des protéines de BHE dans le tissu sain et ischémié d'un animal. a : Marquage du collagène IV – zone ischémiée ; b : Marquage des protéines de BHE – zone ischémiée ; c : Marquage du collagène IV – zone controlatérale ; d : Marquage des protéines de BHE – zone controlatérale.	89
Figure 3.11 : Rapports des surfaces de vaisseaux BHE (visualisés par le marquage des protéines de BHE) / COLL (visualisés par le marquage collagène IV), dans le cortex controlatéral (contro) et ipsilatéral (ipsi) et dans le striatum controlatéral et ipsilatéral pour chaque groupe de rats. Moyenne ± ET. La barre d'erreur représente un ET.* : Différence significative avec P≤0,05.	90
Figure 3.12 : Angiogrammes montrant l'occlusion et la reperfusion de l'ACM.	91
Figure 3.13 : Images représentatives obtenues pour un animal du groupe A (a, e, i, m, q), un animal du groupe B (b, f, j, n, r) et deux animaux du groupe C (c, g, k, o, s et d, h, l, p, t). Les cartes d'ADC ont été obtenues 1h après l'occlusion et avant la reperfusion et l'injection des agents de	

contraste. Les images pondérées T_1 ont été obtenues à 28 et 49 min après la reperfusion. Les cartes de T_1 sont les dernières acquises (48 min après reperfusion environ). Les ROI choisies sont délimitées en blanc. Résolution dans le plan $156 \times 156 \mu\text{m}$	92
Figure 3.14 : Evolutions des T_1 (ms) dans les ROI controlatérales (triangles vides) et ipsilatérales (triangles pleins) pour les animaux qui ont reçu (colonne de gauche) ou non (colonne de droite) des agents de contraste. Le fond grisé représente la période d'infusion du MnCl_2 alors que les flèches indiquent l'injection du bolus de Gd-DOTA. Pour les groupes contrôles, les équations de régression linéaire et les coefficients de corrélation correspondants sont indiqués. Les barres d'erreur représentent un écart-type.....	94
Figure 3.15 : Effet de la reperfusion sur le T_1 dans chaque groupe pour les ROI controlatérales et ipsilatérales. Les animaux ayant reçu des agents de contraste sont regroupés avec les animaux contrôle. Les barres d'erreur représentent un écart-type. L'astérisque dénote une significativité à $P \leq 0,05$	95
Figure 3.16 : Valeurs moyennes du contenu en eau à 2h15 min d'occlusion de l'ACM. Les barres grises représentent les animaux ayant subi l'ischémie cérébrale et les barres blanches, les animaux contrôle. La barre d'erreur représente un ET. * : différence significative à $P \leq 0,01$	96
Figure 4.1 : Protection cérébrale par préconditionnement. D'après Gidday et coll ⁷⁷	105
Figure 4.2 : Exemple de graphique représentant la fonction d'entrée artérielle pour un rat.....	117
Figure 4.3 : Photo montrant les 10 coupes autoradiographiques pour un même rat.....	118
Figure 4.4 : Exemple de courbe d'étalonnage pour un film autoradiographique.....	118
Figure 4.5 : Photo montrant les 10 coupes HE d'un même rat.....	119
Figure 4.6 : Délimitation des régions d'intérêt (en rose) sur les coupes HE.....	119
Figure 4.7 : Délimitation des régions d'intérêt (en noir) sur les coupes autoradiographiques.....	120
Figure 4.8 : Délimitation de la ROI mismatch (en blanc) résultant de la différence des masques ROI hypodébit et ROI œdème.....	120
Figure 4.9 : Exemple de courbe d'étalonnage pour la détermination de la distribution des DSC pour un rat.....	122
Figure 4.10 : Illustration du programme MATLAB développé pour calculer la distribution des DSC à l'intérieur d'un VOI.....	122
Figure 4.11 : VOI (mm^3) pour chaque anesthésique. Moyenne \pm ET.....	125
Figure 4.12 : Coupe autoradiographique située à bregma -2.3 mm pour les 24 rats, groupés par anesthésique.....	127
Figure 4.13 : DSC moyen dans les VOI hémisphère ipsi et contro pour chaque anesthésique. Moyenne \pm ET. is: isoflurane vs sévoflurane ; ip: isoflurane vs propofol ; it: isoflurane vs thiopental ; sp: sévoflurane vs propofol ; st: sévoflurane vs thiopental ; pt: propofol vs thiopental ; dg : hémisphère ipsi vs hémisphère contro.....	128
Figure 4.14 : DSC moyen dans les VOI œdème, mismatch et hypodébit pour chaque anesthésique. Moyenne \pm ET. is: isoflurane vs sévoflurane ; ip: isoflurane vs propofol ; it: isoflurane vs thiopental ; sp: sévoflurane vs propofol ; st: sévoflurane vs thiopental ; pt: propofol vs thiopental....	129

- Figure 4.15 : Volumes tissulaires cumulés (exprimés en % du volume total du VOI considéré) en fonction du DSC dans les VOI hémisphère contro, hypodébit et œdème. La barre d'erreur représente un écart-type. pt : propofol vs thiopental. A droite sont représentés les différents VOI sur une coupe histologique HE et autoradiographique..... 130
- Figure 4.16 : Volumes tissulaires dans le VOI œdème (exprimés en % du volume total du VOI œdème) en fonction du DSC. La barre d'erreur représente un ET. 131
- Figure 5.1 : Spectre d'absorption de l'ICG à une concentration de 6,5 $\mu\text{mol/l}$ dans du plasma sanguin. .. 146
- Figure 5.2 : Variations temporelles simultanées des concentrations d'ICG avec source polychromatique ou avec source laser, mesurées grâce à deux couples d'optodes (distance inter-optode = 6 mm). 147
- Figure 5.3 : Configuration de mesure comprenant une optode émettrice et six optodes réceptrices permettant l'exploration de six zones en forme de « banane ». 148
- Figure 5.4 : Rat n°1. Suivi de l'intensité rétrodiffusée par l'hémisphère ischémié (en noir) et par l'hémisphère controlatéral (en gris) au passage d'un bolus d'ICG, en situation contrôle (avant occlusion), en situation d'ischémie (après occlusion) et en situation de reperfusion. La fenêtre temporelle a une largeur de 8 secondes. Ischémie confirmée par histologie. 149
- Figure 5.5 : Rat n°2. Suivi de l'intensité rétrodiffusée par l'hémisphère ischémié (en noir) et par l'hémisphère controlatéral (en gris) au passage d'un bolus d'ICG, en situation contrôle (avant occlusion), en situation d'ischémie (après occlusion) et en situation de reperfusion. La fenêtre temporelle a une largeur de 8 secondes. Pas de signe d'ischémie à l'histologie. 150
- Figure 5.6 : Rat n°3. Suivi de l'intensité rétrodiffusée par l'hémisphère ischémié (en noir) et par l'hémisphère controlatéral (en gris) au passage d'un bolus d'ICG, en situation contrôle (avant occlusion), en situation d'ischémie (après occlusion). La fenêtre temporelle a une largeur de 8 secondes. Hémorragie cérébrale visualisée à l'histologie. 150
- Figure 5.7 : Rat n°4. Suivi de l'intensité rétrodiffusée par l'hémisphère ischémié (en noir) et par l'hémisphère controlatéral (en gris) au passage d'un bolus d'ICG, en situation contrôle (avant occlusion), en situation d'ischémie (après occlusion) et en situation de reperfusion. La fenêtre temporelle a une largeur de 8 secondes. Ischémie confirmée par histologie. 151
- Figure 5.8 : Rat n°5. Suivi de l'intensité rétrodiffusée par l'hémisphère ischémié (en noir) et par l'hémisphère controlatéral (en gris) au passage d'un bolus d'ICG, en situation contrôle (avant occlusion), en situation d'ischémie (après occlusion) et en situation de reperfusion. La fenêtre temporelle a une largeur de 8 secondes. Ischémie confirmée par histologie. 151
- Figure 5.9 : Rat n°6. Suivi de l'intensité rétrodiffusée par l'hémisphère ischémié (en noir) et par l'hémisphère controlatéral (en gris) au passage d'un bolus d'ICG, en situation contrôle (avant occlusion), en situation d'ischémie (après occlusion) et en situation de reperfusion. La fenêtre temporelle a une largeur de 8 secondes. Pas de signe d'ischémie à l'histologie. 152
- Figure 5.10 : Exemple de dispositif d'imagerie comprenant 9 émetteurs et 4 récepteurs. Les 9 cadrans (E1 à E9) montrent chacune des 9 configurations d'éclairage du système. Ces configurations sont exploitées successivement de gauche à droite et de bas en haut. Sur chaque cadran, le

point d'éclairement est mis en évidence par des cercles concentriques. La zone de mesure d'intensité lumineuse correspondante apparaît en grisé.....	154
Figure 5.11 : Disposition des couples d'émetteur / récepteur sur la tête du rat permettant de définir 16 voxels d'exploration cérébrale.	155
Figure 5.12 : Rat n° 7. Evaluation de la reproductibilité des courbes de bolus pendant la phase contrôle avant occlusion, suite à l'injection de deux bolus d'ICG à 15 minutes d'intervalle.....	156
Figure 5.13 : Rat n°7. Evaluation de la reproductibilité des courbes de bolus pendant la phase d'occlusion, suite à l'injection de deux bolus d'ICG à 15 minutes d'intervalle.....	156
Figure 5.14 : Rats n° 7 et 8. Cartographies des courbes de bolus d'ICG. Comparaison de la phase contrôle et de la phase suivant l'occlusion de l'ACM.....	158
Figure 5.15 : Rats n° 9 et 10. Cartographies des courbes de bolus d'ICG. Comparaison de la phase contrôle et de la phase suivant l'occlusion de l'ACM.....	159
Figure 5.16 : Rat n° 7. Cartographie des temps d'arrivée du bolus d'ICG avant et après occlusion de l'ACM droite. Le carré blanc sur la tête du rat symbolise la zone explorée.....	160
Figure 5.17 : Rat n°8. Cartographie des temps d'arrivée du bolus d'ICG avant et après occlusion de l'ACM droite. Le carré blanc sur la tête du rat symbolise la zone explorée.....	161
Figure 5.18 : Rat n°9. Cartographie des temps d'arrivée du bolus d'ICG avant et après occlusion de l'ACM droite. Le carré blanc sur la tête du rat symbolise la zone explorée.....	162
Figure 5.19 : Rat n°10. Cartographie des temps d'arrivée du bolus d'ICG avant et après occlusion de l'ACM droite. Le carré blanc sur la tête du rat symbolise la zone explorée.....	163

Liste des tableaux.

Tableau 2.1 : Calibration du diamètre des filaments occlusifs. O : oui ; N : non ; NT : non testé ; BT : bulle tympanique.....	58
Tableau 3.1: Souris knockout et mutantes pour l'étude du rôle des oxydants dans l'ischémie cérébrale. + : protection neuronale ; - aggrave l'infarctus ischémique ; NP : pas de protection ; NOS : nitric oxide synthase ; SOD : superoxyde dismutase. AAC : artère carotide commune.	71
Tableau 3.2 : Expression des métalloprotéases (MMP) et de leurs inhibiteurs (TIMP) après une ischémie cérébrale. D'après Cunningham et coll ⁴⁵	72
Tableau 3.3 (1/2) : Données bibliographiques sur l'ouverture de la BHE au cours de l'ischémie cérébrale. HRP : peroxydase de raifort ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; T ₁ W : imagerie pondérée T ₁ ; Gd-DTPA : gadopentétate de méglumine ; ALB : albumine ; AIB : acide aminoisobutyrique ; IgG : immunoglobuline G ; ACM : artère cérébrale moyenne.	76
Tableau 3.3 (2/2) : Données bibliographiques sur l'ouverture de la BHE au cours de l'ischémie cérébrale. HRP : peroxydase de raifort ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; T ₁ W : imagerie pondérée T ₁ ; Gd-DTPA : gadopentétate de méglumine ; ALB : albumine ; AIB : acide aminoisobutyrique ; IgG : immunoglobuline G ; ACM : artère cérébrale moyenne.	77
Tableau 3.4 : Paramètres des séquences IRM utilisées.....	80
Tableau 3.5 : Paramètres physiologiques (moyenne ± écart-type). Les valeurs de gaz du sang issues de chaque prélèvement au cours de l'expérience sont moyennées.	86
Tableau 3.6 : Répartition des types d'atteintes ischémiques par groupe.	88
Tableau 3.7 : Valeurs d'ADC ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) avant la reperfusion pour les groupes B et C.....	91
Tableau 3.8 : Valeurs de T ₁ (ms) avant et après reperfusion.	95
Tableau 3.9 : Concentrations apparentes extrapolées en Mn ²⁺ et Gd-DOTA (moyenne ± ET, $\mu\text{mol/l}$) dans l'hémisphère ipsilatéral pour chaque groupe à la fin de l'expérience.....	100
Tableau 4.1 : Etudes cliniques sur les agents neuroprotecteurs dans l'ischémie. NMDA : N-méthyl-D-aspartate ; GABA : acide gamma-aminobutyrique. D'après Davis ⁴⁶	104
Tableau 4.2 (1/2) : Données bibliographiques sur le préconditionnement anesthésique dans l'ischémie cérébrale. ACM : artère cérébrale moyenne ; MCAO : occlusion de l'artère cérébrale moyenne ; MAC : concentration alvéolaire minimale ; EEG : électroencéphalogramme ; VI : volume d'infarctus.....	107
Tableau 4.2 (2/2) : Données bibliographiques sur le préconditionnement anesthésique dans l'ischémie cérébrale. ACM : artère cérébrale moyenne ; MCAO : occlusion de l'artère cérébrale moyenne ; MAC : concentration alvéolaire minimale ; EEG : électroencéphalogramme ; VI : volume d'infarctus.....	108
Tableau 4.3 : Données bibliographiques sur l'administration d'anesthésiques au cours de la phase aiguë de l'ischémie cérébrale. ACM : artère cérébrale moyenne; MAC : concentration alvéolaire minimale ; VI : volume de l'infarctus.	109

Tableau 4.4 : Paramètres physiologiques (moyenne \pm ET). ^{is} : isoflurane vs sévoflurane ; ^{ip} : isoflurane vs propofol ; ^{it} : isoflurane vs thiopental ; ^{sp} : sévoflurane vs propofol ; st : sévoflurane vs thiopental ; ^{pt} : propofol vs thiopental ; ☼: température corporelle vs température cérébrale.....	123
Tableau 4.5 : Localisation de l'atteinte ischémique observée à deux heures d'occlusion de l'ACM pour chaque anesthésique.....	124
Tableau 4.6 : VOI (mm ³) pour chaque anesthésique. Moyenne \pm ET.	125
Tableau 4.7 : Valeurs de DSC en noir, chez le rat sain éveillé et sous différents anesthésiques, issues de la littérature. Les valeurs de DSC de l'hémisphère contro de notre étude sont indiquées en rouge.....	137

Introduction générale.

La fréquence, la gravité et le coût des accidents vasculaires cérébraux (AVC) en font un problème de santé publique considérable. Dans nos pays industrialisés, ils constituent la troisième cause de décès après l'infarctus du myocarde et les cancers, la première cause de handicap acquis chez l'adulte, la deuxième cause de démence (après la maladie d'Alzheimer) et une cause majeure de dépression tant chez les patients que dans leur entourage ⁶⁴. Chaque année en France, environ 120 000 personnes sont victimes d'un AVC, dont schématiquement 30 000 vont mourir dans les jours ou mois qui suivent, 60 000 vont garder un handicap de sévérité variable et 30 000 vont récupérer sans séquelle. Parmi les survivants, 50 % vont avoir une dépression dans l'année, 25 % seront déments dans les cinq ans qui suivent et seulement 40 % des actifs reprendront leur travail ²⁹. Compte-tenu de leur fréquence et de la gravité de leurs séquelles, les AVC sont parmi les affections les plus coûteuses qui existent.

L'AVC est, selon une définition internationale, "un déficit neurologique soudain d'origine vasculaire". Tout AVC comporte donc d'une part une lésion cérébrale responsable du déficit neurologique, et d'autre part une lésion vasculaire sous-jacente qui est la cause immédiate de l'accident et en explique la soudaineté. On distingue schématiquement 4 types d'AVC : l'hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) lorsqu'un saignement se fait dans les méninges, l'hémorragie cérébrale (HC) lorsqu'un saignement se fait dans le parenchyme cérébral, l'accident ischémique transitoire (AIT) dans lequel le déficit neurologique régresse spontanément en moins d'une heure et où l'imagerie cérébrale est normale, et l'infarctus cérébral (IC) ou accident ischémique constitué caractérisé par une nécrose du parenchyme cérébral responsable du déficit neurologique durable. Les fréquences respectives de ces 4 types d'AVC varient selon les régions du globe et sont pour les pays industrialisés : HSA 5 %, HC 10-15 %, AIT 10-20 %, IC 65-70 % ¹⁴³.

Les AVC ont longtemps été considérés comme une pathologie provoquant des dommages immédiats et irréversibles, laissant peu d'opportunités de traitement à la phase aigüe. Dans le cas des IC, qui sont les AVC les plus fréquents, une grande variété de stratégies d'intervention a été évaluée sans succès jusqu'à la mise en œuvre de la thérapie thrombolytique intraveineuse en 1996, après qu'une étude clinique américaine en ait démontré le bénéfice ¹⁴⁷. L'utilisation de l'activateur tissulaire recombinant du plasminogène (rt-PA) est efficace dans les trois premières heures après le début des symptômes, malgré une augmentation significative du taux d'hémorragies intracrâniennes. A ce jour, après l'hospitalisation dans une unité neuro-vasculaire, la thrombolyse intraveineuse par la levée de l'occlusion artérielle reste le traitement le plus efficace en termes de guérison. D'autres développements pharmacologiques récents ont offert de nouveaux candidats potentiels incluant des agents neuroprotecteurs et thrombolytiques pour la thérapie de l'ischémie cérébrale.

Ces espoirs soulignent la nécessité de poursuivre les investigations des processus physiopathologiques contribuant aux dommages ischémiques, cibles potentielles du traitement aigu des IC. En effet, afin d'accéder à de justes diagnostic et pronostic, une caractérisation précise de l'état du tissu ischémique est cruciale. De plus, la sélection d'une stratégie thérapeutique efficace nécessite une caractérisation précoce et précise de la lésion ischémique.

Dans ce contexte, ce travail de thèse s'intéresse à l'étude préclinique de l'ischémie cérébrale dans un modèle animal de rat. Il s'intègre dans l'une des trois thématiques du laboratoire qui est l'étude de la microvascularisation cérébrale à travers l'utilisation de méthodes d'imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN), histologiques ou optiques. Il a débuté par un travail de mise en place et d'évaluation méthodologique du modèle et s'est poursuivi par l'exploitation de données d'imagerie dans le but de mieux caractériser la physiopathologie ischémique. L'implication de cliniciens neurologues et anesthésistes à cette thématique au sein du laboratoire a guidé l'orientation des expérimentations animales en accord avec les questionnements cliniques posés. C'est pourquoi nous nous sommes en particulier intéressés à la phase aiguë de la maladie qui constitue en clinique l'unique opportunité d'administration d'un traitement thérapeutique. Ce chapitre, divisé en cinq parties, décrit l'utilisation de différents outils d'exploration cérébrale permettant d'accéder à la mesure de paramètres physiologiques indicateurs de l'état ischémique du cerveau.

Le premier chapitre, bibliographique, présente des données cliniques sur la pathologie ischémique. Il rappelle quelques données épidémiologiques sur l'ischémie cérébrale, en précise l'étiologie et fait le point sur les techniques actuelles de diagnostic et de traitement. Une seconde partie est consacrée à la description des principaux aspects physiopathologiques nécessaires à la compréhension des études décrites dans cette thèse.

Le deuxième chapitre est consacré aux différents modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale couramment rencontrés dans la littérature. Leurs avantages et inconvénients en rapport avec la pathologie humaine et les considérations techniques expérimentales y sont décrits. Le choix du modèle utilisé pour nos études est discuté et son travail de mise au point présenté.

Le troisième chapitre concerne l'utilisation du rôle diagnostic et pronostic des méthodes d'imagerie par résonance magnétique (IRM) pour caractériser l'état du tissu cérébral et l'ouverture précoce de la barrière hémato-encéphalique (BHE) au

cours d'une ischémie cérébrale transitoire. L'œdème cérébral consécutif à l'ouverture de la BHE est une complication sévère de l'IC, s'aggravant potentiellement d'une transformation hémorragique chez les patients thrombolysés. La compréhension des mécanismes précoces associés à la reperfusion est donc un objectif important pour améliorer les traitements et l'évolution des IC.

Le quatrième chapitre présente l'étude de l'influence de différents anesthésiques sur le développement de l'ischémie cérébrale, à travers la mesure du débit sanguin cérébral (DSC) et l'évaluation histologique des lésions induites. Le rôle thérapeutique des anesthésiques dans l'ischémie cérébrale suscite actuellement un vif intérêt. Cet intérêt est stimulé par l'idée simple et attirante que les anesthésiques pourraient réduire certains besoins métaboliques et donc, prolonger la durée pendant laquelle le cerveau pourrait tolérer une réduction de l'apport en oxygène. Une utilisation thérapeutique des anesthésiques en clinique pour l'ischémie cérébrale a un fondement de plus en plus rationnel au vue des multiples études ayant déjà démontré un bénéfice réel de leur utilisation chez l'animal.

Enfin, le cinquième chapitre décrit un travail sur l'utilisation d'une méthode d'imagerie optique, la spectroscopie proche-infrarouge, pour la détection de l'ischémie cérébrale chez le rat. Le suivi d'un bolus de colorant simultanément en différentes zones du cerveau, et de manière non-invasive, permet de mettre en évidence des régions où la perfusion cérébrale est altérée suite à l'ischémie. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de Spectrométrie Physique de Grenoble et a fait l'objet d'une partie de la thèse en Physique de Raphaël SABLONG¹⁸². Il sera donc traité plus brièvement.

Chapitre 1 : Données cliniques et physiopathologiques sur l'ischémie cérébrale.

1.1. Données cliniques sur l'ischémie cérébrale.

1.1.1. Définition et classification.

Le mot ischémie est une composition des mots grecs « ischein » (arrêter) et « haima » (sang). L'ischémie cérébrale se définit comme l'arrêt ou l'insuffisance de l'apport sanguin dans le cerveau, qui prive les cellules en oxygène et glucose. Elle est classée en fonction de sa distribution anatomique (globale vs focale) et de sa durée (permanente vs transitoire).

L'ischémie globale fait suite à une sévère diminution du DSC dans tout l'encéphale. Elle peut résulter par exemple d'un arrêt cardiaque, d'une hypotension sévère ou d'une pression intracrânienne élevée (traumatisme crânien par exemple). En clinique, les ischémies globales sont généralement temporaires (arrêt cardiaque suivi d'une réanimation) et les ischémies globales prolongées sont presque toujours fatales.

A l'inverse, l'ischémie focale conduit à un gradient topographique de réduction du DSC dans le territoire vasculaire atteint. Autour d'un « cœur ischémique » où le DSC est dramatiquement réduit se situe une zone « bordure » marginalement perfusée qui reçoit du sang à partir d'artères collatérales. L'ischémie focale résulte habituellement de l'occlusion d'une artère cérébrale. Elle peut être permanente ou transitoire si elle est suivie de reperfusion.

Une période ischémique est souvent suivie d'une période de reperfusion (au moins partielle) par recrutement d'artères collatérales ou par levée spontanée ou interventionnelle de l'occlusion vasculaire. Le rôle de la reperfusion est ambigu. La restauration du DSC, qui permet la reprise de la production d'adénosine triphosphate (ATP), la repolarisation membranaire et la reprise d'une fonction neuronale, semble bénéfique. Cependant, la reperfusion peut également induire ou accélérer bon nombre de processus délétères. Dans ce cas, elle peut être suivie de lésions cérébrales secondaires.

1.1.2. Vascularisation cérébrale et topographie des accidents ischémiques cérébraux.

Chez l'homme, trois troncs artériels sont responsables de la vascularisation cérébrale. Il s'agit de l'artère carotide interne (ACI) droite, de l'ACI gauche et de l'artère basilaire, elle-même formée de l'anastomose de deux artères vertébrales.

L'ensemble est appelé le trépied artériel du cerveau. Ces trois artères majeures montent dans le cou, pénètrent dans la boîte crânienne pour donner leurs branches terminales à la face inférieure du cerveau. Les branches terminales des ACI sont les artères cérébrales antérieures (ACA), les artères cérébrales moyennes (ACM) ou sylviennes, les artères communicantes postérieures (AComP) et les artères choroïdiennes antérieures (AchA). Les branches terminales de l'artère basilaire sont les artères cérébrales postérieures (ACP). Contre la face inférieure du cerveau, les ACA, ACM et ACP réalisent un système anastomotique d'assez gros calibre, appelé Polygone de Willis, du nom de Thomas Willis qui décrit cette remarquable particularité anatomique en 1664 (figure 1.1).

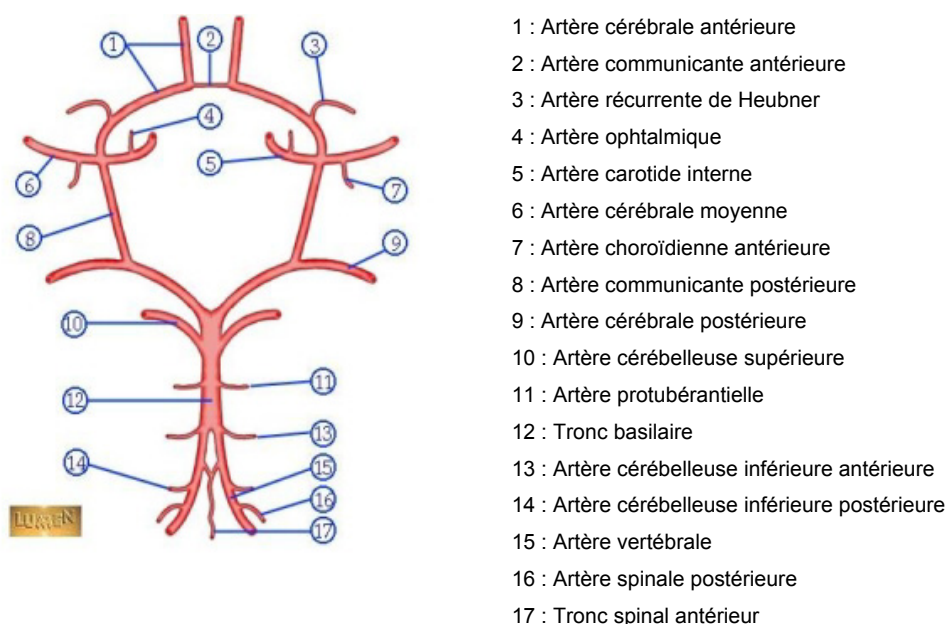


Figure 1.1 : Représentation schématique du polygone de Willis chez l'homme. D'après J.A. Mc Nulty, <http://www.ann.jussieu.fr/~thiriet/csas/Glosr/Bio/Vaisseau/Artery/>.

Le polygone de Willis constitue le principal système anastomotique en réunissant les circulations antérieures et postérieures homo et controlatérales. Il dessine à la base du cerveau un cercle artériel anastomosant dans sa portion antérieure le système carotidien droit et gauche avec l'artère communicante antérieure. Il anastomose dans sa portion postérieure le système carotidien et vertébro-basilaire avec l'artère communicante postérieure. Il existe aussi des anastomoses entre le système carotidien externe et interne (artère ophtalmique), ainsi que des anastomoses cortico-pie-mériennes au niveau des branches corticales des artères cérébrales antérieures, moyennes et postérieures. Par contre, les branches profondes de toutes les artères cérébrales ne s'anastomosent pas. Leur mode de vascularisation est donc de type terminal.

Le rat, qui sera notre modèle d'étude dans cette thèse, possède un polygone de Willis assez ressemblant à celui de l'homme (figure 1.2).

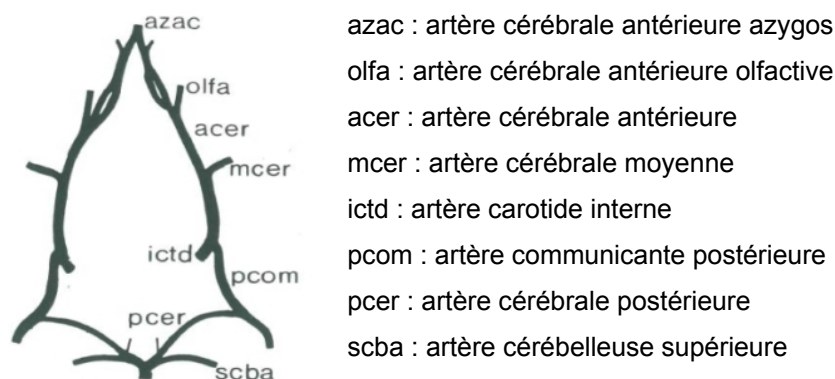


Figure 1.2 : Représentation schématique du polygone de Willis chez le rat. D'après *The Rat Nervous System* ¹⁶⁵.

Quelques différences peuvent être signalées : l'artère communicante antérieure est absente chez le rat, sauf exceptions anatomiques anormales. Les artères cérébrales antérieures fusionnent pour former l'artère cérébrale antérieure azygos à un point où on trouve l'artère communicante antérieure chez l'homme. Le reste du cercle artériel du rat inclut les mêmes vaisseaux que chez l'homme mais les distances relatives et les diamètres sont différents. Chez le rat, le diamètre de l'ACM est d'environ 0,24 mm alors qu'il est de 2,3 à 2,7 mm chez l'homme ¹⁶⁵.

Suivant le territoire vasculaire touché (carotidien ou vertébro-basilaire), plusieurs syndromes cliniques aux symptômes plus ou moins caractéristiques peuvent être évoqués (figure 1.3). Un certain nombre de signes cliniques orientent le diagnostic vers une atteinte de la circulation carotidienne, d'autres vers une atteinte de la circulation vertébro-basilaire, d'autres encore peuvent se voir dans les deux territoires et c'est alors l'association des signes qui permettra le diagnostic topographique. Il est cependant souvent impossible de déterminer le territoire avec certitude. En clinique, l'infarctus de l'ACM (artère sylvienne) représente 70 % des infarctus du territoire carotidien. Il englobe tout le territoire de l'ACM dans 20 à 30 % des cas quand il est secondaire à l'occlusion de son tronc, en amont des collatérales profondes lenticulostrées et en l'absence de suppléance efficace. L'évolution est souvent mortelle et seulement 10 % des patients seront de nouveau autonomes.

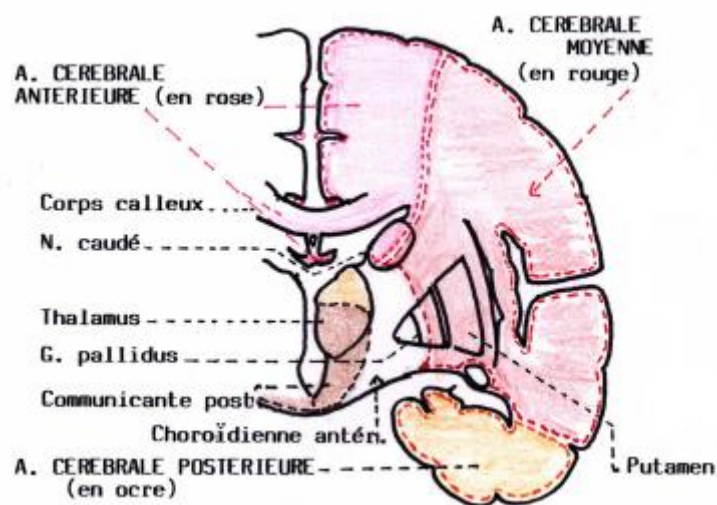


Figure 1.3 : Représentation schématique des différents territoires artériels cérébraux chez l'homme. Schéma issu du site internet de la Faculté de Médecine de Brest, http://www.univ-brest.fr/S_Comm/Biblio/ANATOMIE/Web_anat/Snc/Vaisseaux/Territoires_cerveau.htm.

1.1.3. Données épidémiologiques.

Il est assez difficile de trouver dans la littérature des données épidémiologiques spécifiques de l'ischémie cérébrale. On trouve le plus fréquemment des données concernant les AVC dans leur globalité, incluant accidents ischémiques (85 % des cas) et hémorragiques (15 % des cas). Les données qui suivent concernent donc l'ensemble des deux types.

1.1.3.1. Mortalité.

Définition : elle exprime le taux de décès par unité de temps et dans une population donnée, en général par année et pour 100 000 habitants.

De très nombreuses études ont été consacrées à l'épidémiologie des AVC, la plus importante étant l'étude MONICA de l'OMS¹⁰. Les données épidémiologiques françaises sur les AVC provenaient du seul registre de Dijon qui a estimé l'incidence globale entre 150 et 240/100 000 habitants entre 1985 et 1994, le taux augmentant fortement avec l'âge. Un rapport annuel sur l'état de santé de la population française¹²⁷ en 2006 mentionne que les AVC sont la principale cause de handicap chez l'adulte, la seconde cause de décès après l'infarctus du myocarde, la première cause de décès chez la femme et la seconde cause de démence¹⁸⁴. En 2002, le nombre de

décès par AVC était d'environ 37 000, ce qui représentait le quart des décès par maladie de l'appareil circulatoire et 7 % de l'ensemble des décès. Le nombre total de décès par AVC était un peu plus élevé pour les personnes de 65-84 ans (48,2 % des décès) que pour les personnes de 85 ans ou plus (43,5 %) mais les taux, rapportés aux effectifs des populations correspondantes, étaient beaucoup plus élevés pour les personnes de 85 ans ou plus (1 404,8/100 000 contre 206,8/100 000 entre 65 et 84 ans). En 2002, les décès étaient majoritairement féminins (58 % du nombre total de décès). Toutefois, les taux de mortalité par AVC demeuraient constamment plus élevés dans la population masculine (23,2 vs. 11,9/100 000 entre 45 et 64 ans, 247,4 vs. 176,7/100 000 entre 65 et 84 ans et 1438,0 vs. 1392,3/100 000 à 85 ans ou plus), les femmes étant beaucoup plus nombreuses à ces âges. Selon les données de l'OMS, la mortalité due aux AVC est en baisse dans tous les pays industrialisés depuis 50 ans, probablement grâce aux progrès faits dans la prise en charge des patients à la phase aiguë de la maladie ainsi qu'aux progrès en matière de diagnostic rendus possibles par le développement des techniques de neuroimagerie. Avec un taux de décès standardisé égal à 39/100 000, la France était en 2000 le pays où la mortalité par AVC était la plus faible de l'Union européenne, les moyennes étant de 67,7/100 000 pour l'Union européenne à 25.

1.1.3.2. Incidence.

Définition: nombre de nouveaux cas d'une maladie donnée pendant une période donnée pour une population indiquée.

En France, l'incidence annuelle des AVC est en moyenne de 2,5/1 000 habitants. L'incidence des AVC augmente exponentiellement avec l'âge et est, de ce fait, souvent considéré comme une maladie affectant principalement le sujet âgé. Hors, si 75 % des AVC surviennent chez des sujets de plus de 65 ans, 20 % des patients ont moins de 60 ans et sont en âge de travailler. En France, sur les 140 000 malades par an, 38 000 ont moins de 65 ans, 7000 (dont 400 en décèdent) ont entre 24 et 44 ans. Aux Etats-Unis, les AVC représentent la 6^{ème} cause de mortalité des personnes de 24 à 44 ans ¹⁵⁵. Toutes les études épidémiologiques ont montré que l'incidence des AVC dans leur ensemble avait baissé entre 1950 et 1980 dans l'ensemble des pays développés mais que cette diminution était aujourd'hui terminée ²¹¹. La principale explication en est le vieillissement de la population : l'incidence par tranche d'âge des AVC diminue encore grâce à une meilleure prise en charge des facteurs de risque mais le risque d'AVC augmentant avec l'âge, l'incidence globale reste stable.

1.1.3.3. Prévalence.

Définition: nombre total de cas d'une maladie donnée dans une population précise à un temps donné. Différent de l'incidence qui se rapporte au nombre de nouveaux cas dans une population à un moment donné.

La prévalence globale est de 4 à 8 pour 1 000 habitants dans les pays occidentaux soit environ 500 000 cas en France. Comme l'incidence, la prévalence augmente avec l'âge. Dans la tranche d'âge de 65 à 84 ans, la prévalence moyenne dans plusieurs pays de l'Europe de l'ouest est de 4,8 % et après 75 ans, de 7,1 %⁵⁰. La prévalence augmente dans les deux sexes jusqu'à 89 ans où elle atteint 9,9 % chez l'homme et 8,3 % chez la femme. Au-delà, elle diminue chez les hommes (6,3 %) et se stabilise chez la femme (8,4 %).

1.1.3.4. Placement en centres de soins de longue durée.

Dans les suites d'un AVC, 2/3 des patients gardent des séquelles physiques, cognitives ou psychologiques. Dans une méta-analyse regroupant les données de 4 études européennes, le handicap lié aux séquelles multiplie par 3 le risque d'être placé en institut spécialisé après un AVC. Le pourcentage des personnes placées augmente avec l'âge pour atteindre 30 % après 75 ans avec en très grande majorité des femmes¹⁹¹.

En résumé, au vue des données épidémiologiques, les tendances évolutives sont une baisse de la mortalité, une stabilisation de l'incidence, une augmentation de la prévalence et du recours aux structures de soins de longue durée (et donc du coût).

1.1.4. Etiologies.

Les étiologies des accidents ischémiques cérébraux sont principalement :

1. L'athérome des artères cervicales et intracrâniennes et de l'arche aortique. Il est responsable de 40 à 50 % des accidents ischémiques et est essentiellement localisé à l'origine des vaisseaux cervicaux, en particulier de la carotide interne. L'athérome provoque des accidents ischémiques par 3 mécanismes principaux : (i) la migration thromboembolique d'artère à artère à partir d'une plaque, (ii) la thrombose *in situ* (sur plaque) d'une artère et (iii) un

mécanisme hémodynamique en présence d'une plaque sténosante importante ou bilatérale chez des patients ayant une faible suppléance.

2. Les embolies d'origine cardiaque. Elles sont la cause de 25 à 35 % des accidents ischémiques avec, comme source la plus fréquente, la fibrillation auriculaire. Viennent ensuite les cardiopathies ischémiques et valvulaires, l'endocardite infectieuse et des pathologies malformatives telles que le foramen ovale perméable (persistance d'une communication inter-auriculaire entre les deux oreillettes) et/ou l'anévrisme du septum inter-auriculaire.
3. Les dissections artérielles sont responsables d'au moins 20 % des accidents ischémiques du sujet jeune. Elles sont favorisées par un traumatisme ou peuvent survenir spontanément. La « déchirure » ou dissection de la paroi artérielle est provoquée par du sang pénétrant une rupture intimale ou par une hémorragie interstitielle. Les accidents ischémiques sont favorisés par la constitution de thrombus au sein de la lumière artérielle et par une chute du débit en relation avec la sténose ou l'occlusion induite par l'hématome de paroi.
4. La lipohyalinose, qui correspond à une surcharge de la paroi des petites artères perforantes (moins de 200 μm) provoquée par l'hypertension artérielle, est à l'origine d'occlusions artérielles conduisant à des infarctus profonds de petite taille (lacunes) au sein de la substance blanche et des noyaux gris centraux.

Des modifications hémodynamiques locales ou systémiques peuvent également entraîner une réduction de la perfusion cérébrale en dehors de toute artériopathie.

1.1.5. Facteurs de risque et prévention.

Comme les cardiopathies ischémiques, les IC (et plus généralement les AVC) partagent de nombreux facteurs de risque. Grâce aux travaux développés depuis plus d'un demi-siècle, notamment par les américains dans l'étude de Framingham, la nature multifactorielle des IC est clairement établie. Plus de 300 facteurs de risque de toute nature, constitutionnels, comportementaux ou environnementaux ont été identifiés ²²⁸. Certains peuvent faire l'objet d'actions de prévention : l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, la consommation de tabac, le diabète, la sédentarité, la surcharge pondérale et l'obésité.... D'autres permettent d'identifier des groupes

particulièrement exposés : l'âge, le sexe (masculin), les antécédents familiaux contribuent ainsi de façon indépendante au risque de survenue des accidents ischémiques cérébraux. La catégorie socioprofessionnelle est associée à plusieurs facteurs de risque. L'hypertension artérielle reste le plus important facteur de risque modifiable de l'IC dans les deux sexes et quel que soit l'âge puisqu'il en multiplie le risque par 4 et est présent chez 65 % des patients. L'efficacité du traitement antihypertenseur chez des sujets hypertendus a été prouvée dans de nombreux essais randomisés et confirmée par plusieurs méta-analyses²⁰².

Certains facteurs de risque ne sont pas modifiables, comme l'âge, le sexe, les antécédents familiaux, l'origine ethnique. Les facteurs modifiables sont plus nombreux et leur addition chez un même sujet a un effet multiplicatif. Ceci explique que chez un sujet donné, la prévention comporte souvent deux types de mesures complémentaires : une prévention globale dont le bénéfice s'étend souvent aux autres pathologies vasculaires (cas de l'hypertension artérielle) et une prévention ciblée, qui a pour but la réduction du risque spécifique conféré par un facteur donné et qui relève d'une stratégie individuelle (endarterectomie carotidienne).

1.1.6. Diagnostic des accidents ischémiques cérébraux.

Il s'agira déjà de poser le diagnostic d'un AVC puis d'en déterminer le type (ischémique ou hémorragique). Le diagnostic d'un AVC peut être difficile compte-tenu de la diversité des symptômes et des nombreux diagnostics différentiels existants. La qualité du diagnostic dépend de l'interrogatoire approfondi du patient et des témoins. La même attention devra être portée tant aux symptômes eux-mêmes qu'à leur chronologie et à leurs circonstances de survenue. Le début est généralement brusque, instantané ou rapidement progressif avec une inconstante altération de la vigilance. Il entraîne d'emblée un ou plusieurs déficits neurologiques dépendant du siège de la lésion cérébrale. Le tableau constitué peut associer :

1. Des déficits moteurs (parésie, paralysie, hypotonie)
2. Des déficits sensitifs (paresthésies, dysesthésies, hypo ou anesthésie)
3. Des troubles du langage (aphasie, troubles de la compréhension)
4. Des troubles cognitifs (troubles attentionnels, confusion, troubles de la mémoire, héli-négligence)
5. Des déficits visuels (hémianopsie)
6. Des troubles de l'affect (changements d'humeur, syndromes dépressifs)

La soudaineté d'installation, bien que très évocatrice, n'est pas spécifique de l'AVC car des déficits focaux soudains peuvent parfois être observés dans d'autres affections cérébrales telles que les tumeurs, les hématomes sous-duraux voire la sclérose en plaques. Mais le contexte, les examens complémentaires et l'évolution permettent le plus souvent de trancher rapidement. Le territoire artériel est précisé grâce à la confrontation des données cliniques et de l'imagerie cérébrale. Le pourcentage de faux diagnostics positifs chez les patients admis pour un AVC est d'environ 20 %. L'établissement d'un diagnostic précis est pourtant primordial avant la mise en route rapide des mesures thérapeutiques adéquates. L'imagerie cérébrale est toujours nécessaire sans délai pour affirmer le diagnostic et préciser la nature ischémique ou hémorragique de l'AVC. Le scanner cérébral (Computed Tomography scanner) est utilisé dans la majorité des centres hospitaliers. Il permet le diagnostic d'hémorragie cérébrale (hyperdensité) et parfois d'infarctus cérébral si le patient est vu tard (hypodensité franche à plus de 24 h) et que l'accident est relativement étendu. Le scanner est donc insuffisamment performant pour la majorité des patients vus aux urgences qui englobent les accidents ischémiques vus précocement (dans les premières heures), les infarctus de petite taille et les infarctus sus-tentoriels. Leur diagnostic est d'ailleurs difficile : dans une étude américaine de 1998 portant sur 54 examens tomographiques, 17 % des médecins urgentistes, 40 % des neurologues et 52 % des radiologues ont identifiés avec une sensibilité de 100% une hémorragie cérébrale ¹⁹². De plus, le diagnostic différentiel de nombreuses pathologies cérébrales aiguës est difficilement réalisable au scanner : affections démyélinisantes, tumeurs cérébrales infiltrantes, encéphalites.... Au contraire du scanner, l'IRM montre immédiatement des anomalies qui permettent un diagnostic certain des accidents ischémiques dès les premières heures. Malheureusement, cette technique n'est pas encore suffisamment répandue dans tous les lieux d'accueil d'urgences. Elle est pourtant la meilleure technique d'imagerie pour le diagnostic positif et pour choisir les modalités de prise en charge des accidents ischémiques aigus. L'IRM était réalisable en urgence chez 90 % des patients, les 10 % restant correspondant aux contre-indications de l'IRM (pacemaker cardiaque) ou aux patients trop agités ou nécessitant une surveillance importante du fait de troubles respiratoires ou de la déglutition ¹. Les techniques d'IRM, utilisées en clinique depuis une vingtaine d'années, se sont progressivement améliorées et diversifiées de telle sorte qu'on en distingue plusieurs actuellement :

1. L'IRM morphologique se compose de séquences écho de spin pondérées T_1 et T_2 . Avec ces séquences classiques, le parenchyme ischémié est en hypersignal T_2 à partir de la 6^e heure et en hyposignal T_1 à partir de la 16^e heure environ. La séquence FLAIR, pondérée T_2 et avec une annulation du

signal provenant du liquide céphalorachidien, permet de mettre en évidence des modifications minimales aussi bien dans les accidents ischémiques profonds que dans les petits accidents ischémiques corticaux, en permettant l'augmentation du contraste des tissus pathologiques (figure 1.4 a).

2. L'IRM de diffusion consiste à étudier les mouvements des protons de l'eau tissulaire. Sur le plan physiopathologique, il existe un déplacement d'eau du secteur extracellulaire vers le secteur intracellulaire au cours du développement de l'œdème cellulaire. Or, selon leur localisation, les molécules d'eau ne diffusent pas de la même manière. Il en résulte que le coefficient de diffusion de l'eau au sein du tissu ischémié pendant l'œdème cellulaire est plus faible que le coefficient de l'eau au sein du tissu normal. Techniquement, l'atténuation de la réduction du signal de diffusion correspondant à la lésion se traduit à l'IRM pondérée en diffusion par un hypersignal (figure 1.4 b). Le degré de restriction des mouvements protoniques peut être quantifié en établissant la cartographie du coefficient de diffusion apparent (ADC), qui montre un hyposignal dans la zone tissulaire ischémiée. L'IRM de diffusion révèle très précocement les zones atteintes par un œdème cytotoxique, lui-même témoin d'une ischémie sévère. Cette technique est très sensible pour le diagnostic de l'ischémie cérébrale aiguë mais sa spécificité est imparfaite puisque d'autres pathologies aiguës peuvent montrer une diminution de l'ADC. L'intérêt de l'ADC est qu'il évolue au cours du temps. Classiquement, l'ADC est réduit les premiers jours de l'infarctus, puis augmente par la suite pour devenir supérieur à sa valeur initiale en phase de chronicité ⁶⁷. Cette progression naturelle permet de distinguer schématiquement 3 phases d'infarctus : aigu (identification de la zone lésée en hyposignal) subaigu (4 à 10 jours, disparition de l'hyposignal) et chronique (hypersignal lié à l'augmentation de l'eau extracellulaire au sein de la cicatrice).
3. L'Angiographie par Résonance Magnétique (ARM), avec ou sans injection de produit de contraste, permet de visualiser les gros vaisseaux (figure 1.3 c). Le principe repose sur la génération d'un hypersignal vasculaire lié à un phénomène d'entrée de coupe: les protons mobiles pénètrent dans la coupe avec une aimantation à l'équilibre qui induira un signal intense lors de l'impulsion RF, alors que les protons immobiles, continuellement soumis aux impulsions RF, ont leur aimantation saturée et ne produiront qu'un très faible signal. La circulation collatérale au sein du cercle de Willis est bien visualisée quand le diamètre des vaisseaux dépasse un millimètre et que la circulation

sanguine y est rapide. En pratique, l'ARM est utilisée pour diagnostiquer les lésions des gros troncs.

4. L'IRM de perfusion nécessite l'injection d'un agent de contraste et fournit des informations hémodynamiques de la microvascularisation cérébrale. Grâce à l'analyse du transit du produit de contraste administré en bolus intraveineux, des images semi-quantitatives du temps de transit circulaire moyen, du volume et du débit sanguin cérébral peuvent être générées. L'IRM de perfusion permet d'identifier très précocement la topographie et l'étendue de l'hypoperfusion. L'imagerie de diffusion couplée à l'imagerie de perfusion permet de distinguer plusieurs situations pathologiques différentes¹ : (1) une zone d'hypoperfusion plus large que la zone de diminution de l'ADC, suggérant une ischémie avec une possible zone de pénombre circonférentielle pouvant être potentiellement sauvée, (2) une zone d'hypoperfusion congruente avec la zone d'anomalies de l'ADC suggérant une extension maximale de l'infarctus et un mauvais pronostic et (3) une absence d'hypoperfusion dans une région montrant un ADC anormal.

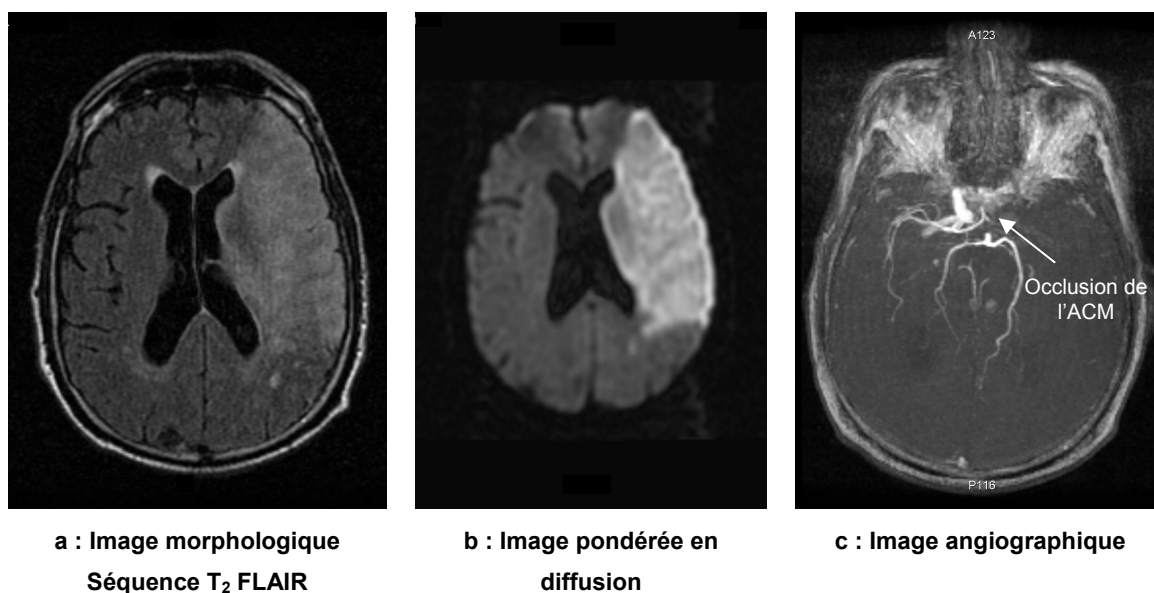


Figure 1.4 : Illustration des différentes images IRM réalisées en clinique pour le diagnostic d'un AVC chez un même patient (ici, 24h après le début des signes cliniques : infarctus bien visible en T₂ FLAIR). Images aimablement fournies par le Dr O. DETANTE, Unité Neuro-Vasculaire, Département de Neurologie du CHU de Grenoble.

Enfin, d'autres examens complémentaires peuvent être réalisés pour préciser le mécanisme de l'AVC. Il s'agit en particulier des explorations ultrasonores des vaisseaux intra et extracrâniens qui permettent de faire le diagnostic, au lit du patient, d'une sténose serrée ou d'une occlusion de l'ACI. Une exploration artérielle radiologique (angiographie par rayons X après injection d'un produit de contraste) sera effectuée si une malformation vasculaire est suspectée. Elle a l'avantage de permettre un traitement direct par des techniques d'embolisation endovasculaires des artères constitutives ou nourricières de la malformation. Le scanner de perfusion, en distinguant zone nécrosée et zone de pénombre, peut montrer une valeur pronostique sur la taille de l'infarctus final et le pronostic clinique.

1.1.7. Traitement de l'accident ischémique cérébral.

Il existe des mesures générales qui s'appliquent à tous les AVC et qui constituent la base du traitement à la phase aiguë permettant de diminuer la mortalité et d'améliorer le pronostic. Elles consistent à :

1. Assurer la liberté des voies aériennes et administrer de l'oxygène en cas d'hypoxémie.
2. Surveiller étroitement l'état neurologique et les fonctions vitales.
3. Surveiller et traiter une hyperglycémie.
4. Surveiller la température et traiter une hyperthermie > 37,5 °C.
5. Détecter et corriger les désordres électrolytiques.
6. Respecter l'hypertension artérielle permettant de maintenir une pression de perfusion cérébrale correcte et bénéfique, sauf en cas de comorbidité (association de deux maladies chez le même individu) le nécessitant (développement d'un œdème pulmonaire par exemple).
7. Traiter les infections par antibiothérapie (pneumopathies d'inhalation et infections urinaires fréquentes pouvant se compliquer en septicémies).
8. Détecter les troubles de la déglutition et prévenir les pneumopathies d'inhalation.
9. Mobiliser précocement les patients pour éviter les complications de décubitus (inhalation, escarres, phlébites...).

En plus du traitement symptomatique, 3 stratégies spécifiques complémentaires peuvent être envisagées dans le cas des infarctus cérébraux :

1. La reperfusion cérébrale et la prévention des récurrences ischémiques par des agents anti-thrombotiques.
2. La neuroprotection.
3. Le traitement des complications de l'ischémie cérébrale et principalement de l'œdème cérébral.

A ce jour, seuls les agents anti-thrombotiques ont fait preuve de leur efficacité dans des études randomisées. Il faut rappeler qu'ils comportent tous un risque secondaire d'hémorragie cérébrale et qu'ils ne peuvent être utilisés qu'après avoir exclu une hémorragie cérébrale primaire, ce qui souligne d'emblée la nécessité absolue de disposer d'un accès 24h/24 à la neuroimagerie.

Trois grands types d'anti-thrombotiques ont été étudiés : les antiplaquettaires, les anticoagulants et les thrombolytiques.

L'aspirine est l'antiplaquettaire le plus étudié à ce jour à la phase aiguë de l'IC dans des essais de phase III. Si la thrombolyse est contre-indiquée, généralement parce que les patients parviennent trop tard à l'hôpital, l'aspirine peut représenter un traitement alternatif. Les études CAST³⁴ et IST¹⁰³ ont montré une réduction de la mortalité de 4 pour 1 000 patients traités. Les autres antiagrégants plaquettaires, en particulier les inhibiteurs de la glycoprotéine IIb/IIIa (fibane) ont été pour l'instant peu étudiés dans l'AVC aigu et leur rôle est encore mal évalué.

Les anticoagulants regroupent l'héparine non fractionnée, l'héparine de bas poids moléculaire et les héparinoïdes. Les essais consacrés aux héparines à la phase aiguë de l'IC n'ont démontré aucun effet bénéfique du traitement¹⁰³.

Actuellement, la thrombolyse systémique intraveineuse, à défaut d'être la panacée, est une véritable avancée thérapeutique. Essayés depuis plus de 20 ans dans l'IC et abandonnés à cause de leur risque hémorragique, les thrombolytiques ont effectué un retour en force depuis une dizaine d'années en raison de leur efficacité inégalée sur le nombre de patients récupérant sans séquelle. Cette efficacité concerne essentiellement le rt-PA puisque 3 études consacrées à la streptokinase ont été arrêtées prématurément du fait d'un excès de mortalité précoce expliquée par des hémorragies intracrâniennes. Le rt-PA intraveineux a été étudié dans 4 grandes études randomisées dont une seule, l'étude américaine NINDS²¹⁰, est positive. Six cent vingt quatre patients y ont été traités par rt-PA intraveineux 0,9 mg/kg ou placebo dans les 3 heures. Cette étude a montré une diminution non significative de la mortalité (4%) et une réduction significative du degré de handicap à 3 mois par plusieurs échelles fonctionnelles. L'étude ECASS I⁸⁰ a inclus 620 patients traités par rt-PA intraveineux à 1,1 mg/kg ou placebo dans les 6 premières heures. La négativité de cette étude a été mise sur le compte d'une inclusion trop importante de patients ayant un infarctus sévère et/ou d'une trop forte dose de thrombolytique. L'étude

ECASS II ⁸¹ a inclus 800 patients traités par rt-PA intraveineux 0,9 mg/kg ou placebo dans les 6 premières heures. Le pourcentage de patients ayant une évolution favorable n'était pas différent entre les 2 groupes mais les hémorragies étaient plus fréquentes sous rt-PA que sous placebo. L'étude ATLANTIS ⁴¹ a porté sur 547 patients traités à 0,9 mg/kg de rt-PA ou placebo entre 3 et 5 heures. Elle n'a pas constaté de supériorité du rt-PA quant au pourcentage de bonne récupération mais le taux d'hémorragie était plus élevé sous rt-PA. Plusieurs méta-analyses de ces 4 études ont été effectuées et confirment que le rt-PA intraveineux donné dans les 3 heures après le début des symptômes augmente significativement le nombre de patients guérissant sans séquelle au prix d'un excès d'hémorragie ne modifiant pas la mortalité globale ²²². L'expression « time is brain », relatant qu'un patient non traité perd environ 1,9 millions de neurones chaque minute, souligne l'urgence d'administration d'un traitement thérapeutique dans l'ischémie cérébrale ¹⁸⁷.

La thrombolyse intra-artérielle locale par la pro-urokinase a été étudiée dans deux essais PROACT I et II ^{70, 238} chez des patients ayant une occlusion de l'artère sylvienne et traités dans les premières six heures. Les résultats vont dans le même sens que pour le rt-PA mais l'allongement de la fenêtre thérapeutique à 6 heures est un réel avantage. Cependant, la nécessité d'une angiographie, d'un neuroradiologue interventionnel et le groupe restreint de patients auxquels elle s'adresse en limitent l'utilisation pratique.

L'intérêt d'un traitement neuroprotecteur a été évalué dans plusieurs dizaines d'essais qui se sont révélés tous décevants, contrastant fortement avec les études positives menées chez l'animal ¹⁴⁶. Les inhibiteurs calciques ont été les plus évalués. Une méta-analyse de 29 essais totalisant 7 665 patients a conclu à leur absence de bénéfice ⁹⁴. Leur toxicité (effet hypotenseur), leur neurotoxicité, une fenêtre thérapeutique trop longue ou encore une durée de traitement insuffisante pourraient expliquer ces mauvais résultats. Des études sont en cours sur l'hypothermie qui est une autre forme de neuroprotection.

Les traitements chirurgicaux existent dans la prise en charge des IC mais sont restreints principalement aux infarctus du cervelet qui s'accompagnent souvent d'un œdème cérébral responsable d'une compression du tronc cérébral, d'une hydrocéphalie et finalement d'un engagement cérébral grave. Dans ce cas, la réalisation d'une dérivation ventriculaire ou d'une craniotomie occipitale permet d'éviter l'issue fatale. L'hémicraniotomie peut également être utilisée dans les infarctus sylviens complets dits « malins » pour diminuer la pression intracrânienne et éviter la compression du tissu cérébral.

Outre les mesures générales et les traitements spécifiques, un autre facteur déterminant dans l'amélioration du pronostic des accidents ischémiques est la prise en charge rapide et spécifique du patient dans des unités de soins appelées unités neuro-vasculaires ou « stroke-units ». Cette hypothèse a donné lieu, dans les années 50, à diverses expériences pilotes, mais c'est principalement à partir des années 80 que des essais cliniques randomisés ont démontré le bénéfice de ces unités. Ces essais cliniques ont fait l'objet de méta-analyses^{93,205} et ont apporté des résultats très favorables et robustes sur le plan statistique. Globalement, la prise en charge en unité neuro-vasculaire permet d'éviter un décès ou dépendance pour 20 patients traités. Il a été calculé que si toutes les victimes d'un AVC sur 1 million d'habitants étaient hospitalisées dans ces structures, 107 décès ou états de dépendance seraient évités chaque année⁸⁴. Le bénéfice de ces unités de soins provient de la précocité de la prise en charge multidisciplinaire, de la diminution des complications liées à l'immobilisation, de l'efficacité des traitements mis en œuvre et de la précocité de la rééducation spécialisée.

1.2. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale.

L'ischémie induit des mécanismes physiopathologiques variés étroitement imbriqués et agissant de concert, qui entraînent une cascade d'évènements moléculaires aboutissant à la mort cellulaire (figure 1.5).

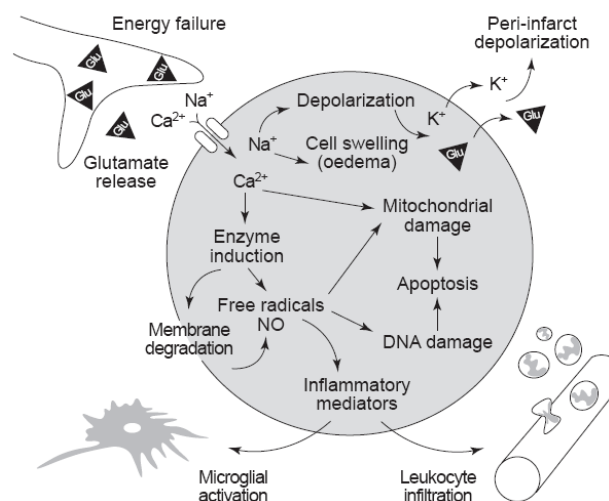


Figure 1.5 : Mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'ischémie cérébrale focale. D'après Dirnagl et coll⁵⁴.

1.2.1. DSC et métabolisme énergétique.

Le DSC est dépendant de la pression de perfusion cérébrale (PPC) qui se définit comme la pression artérielle moyenne (PAM) moins la pression intracrânienne (PIC). En conditions normales, le DSC est maintenu relativement constant grâce au phénomène d'autorégulation, qui assure un apport sanguin adéquat indépendant des fluctuations de la PPC entre 50 et 140 mm Hg environ chez l'homme ¹⁰⁶. Le DSC peut ainsi être ajusté en réponse à des changements du contenu en oxygène ou dioxyde de carbone du sang. L'hypoxie et l'hypercapnie induisent une vasodilatation tandis que l'hyperoxie et l'hypocapnie conduisent à une vasoconstriction ¹⁰². En situation d'ischémie, si la suppléance collatérale ne suffit pas à maintenir une PPC normale à l'intérieur du territoire artériel atteint, la réduction initiale de l'apport sanguin peut être compensée un temps par ces mécanismes physiologiques de régulation du débit. Le déclin de la PPC entraîne en premier lieu une vasodilatation compensatoire des vaisseaux sanguins. Plus tard, le métabolisme anaérobie entraîne une acidose lactique et, en conséquence, une vasodilatation modulée par le pH. Finalement, quand les vaisseaux sanguins sont complètement dilatés, l'autorégulation et la réactivité au CO₂ sont abolies et le DSC suit passivement les fluctuations de la pression artérielle systémique. Sachant que le cerveau couvre ses besoins énergétiques presque exclusivement à partir de l'oxydation du glucose, une réduction de l'apport en oxygène et en glucose, combinée avec une élimination restreinte des métabolites intermédiaires et finaux, conduit à une situation cellulaire délétère. Dans le cerveau intact, l'activité métabolique globale représente la somme du métabolisme corrélé à l'activation (transmission synaptique, potentiels d'action) et du métabolisme basal assurant les fonctions cellulaires vitales. Dans des conditions pathologiques comme l'ischémie, une hiérarchie des fonctions cellulaires énergie-dépendantes s'instaure. Des niveaux de DSC critiques en dessous desquels des fonctions cérébrales particulières se détériorent ou des processus débutent ont été ainsi définis. Le concept de seuils de DSC critiques dans l'ischémie a ainsi été décrit en 1977 par Astrup et coll. ¹². Ce concept définit précisément les seuils de DSC nécessaires pour permettre la transmission synaptique et l'homéostasie ionique. Les régions cérébrales dont le DSC se situe entre ces deux seuils ont été appelées «pénombre». La pénombre est caractérisée par des conditions ischémiques qui entraînent une suppression fonctionnelle sans dommages structuraux ¹¹. Ce concept fera l'objet d'un paragraphe ultérieur.

1.2.2. Seuils de viabilité ischémique.

Durant les premières heures de l'occlusion vasculaire, différentes fonctions cérébrales sont perturbées à des niveaux de DSC variés. Les valeurs de DSC absolues qui définissent ces seuils montrent une grande variabilité car dépendantes de la technique de mesure, de l'espèce animale, du modèle d'ischémie et du type d'anesthésie utilisé. Les données suivantes sont issues de la revue de Hossmann publiée en 2006 ⁹⁶. Le DSC normal chez le rat dans la substance grise est en moyenne de 120 ml/100g/min. La synthèse protéique décline à partir de 55 ml/100g/min et est totalement abolie en dessous de 35 ml/100g/min. L'utilisation du glucose augmente à environ 35 ml/100g/min et chute en dessous de 25 ml/100g/min (figure 1.6). Cette zone de DSC correspond à l'accumulation de lactate et à l'acidose tissulaire. Pour des DSC inférieurs à 26 ml/100g/min, l'acidose devient très prononcée et l'ATP ainsi que la phosphocréatine (PCr) commencent à décliner. Le seuil de perte fonctionnelle d'activité semble indépendant de la durée de l'ischémie : un DSC en dessous de 23 ml/100g/min environ provoque immédiatement une altération de la fonction neuronale. Pour des DSC de 10-12 ml/100g/min, le potassium extracellulaire augmente drastiquement, indiquant la perte des gradients ioniques transmembranaires normaux. En condition normale, le potentiel de membrane est maintenu par la Na/K ATPase qui permet l'extrusion de 3 ions Na⁺ en échange de 2 ions K⁺. Le déséquilibre de charge est compensé par la sortie d'un Cl⁻. La force osmotique diminuant, l'eau sort de la cellule. De cette façon, la concentration extracellulaire en Na⁺ est 10 fois supérieure à la concentration intracellulaire tandis que la concentration intracellulaire en K⁺ est 40 fois supérieure à l'extracellulaire. Ces processus actifs primaires sont hautement consommateurs d'énergie puisque environ la moitié de la production d'ATP est utilisée pour maintenir les gradients ioniques transmembranaires. La déplétion en ATP entraîne le dysfonctionnement de la Na/K ATPase et a pour conséquence une chute du potentiel de membrane. Les ions se redistribuent alors passivement à travers les membranes, l'eau rentre dans la cellule provoquant un gonflement cellulaire appelé «œdème cytotoxique» ou encore «œdème cellulaire».

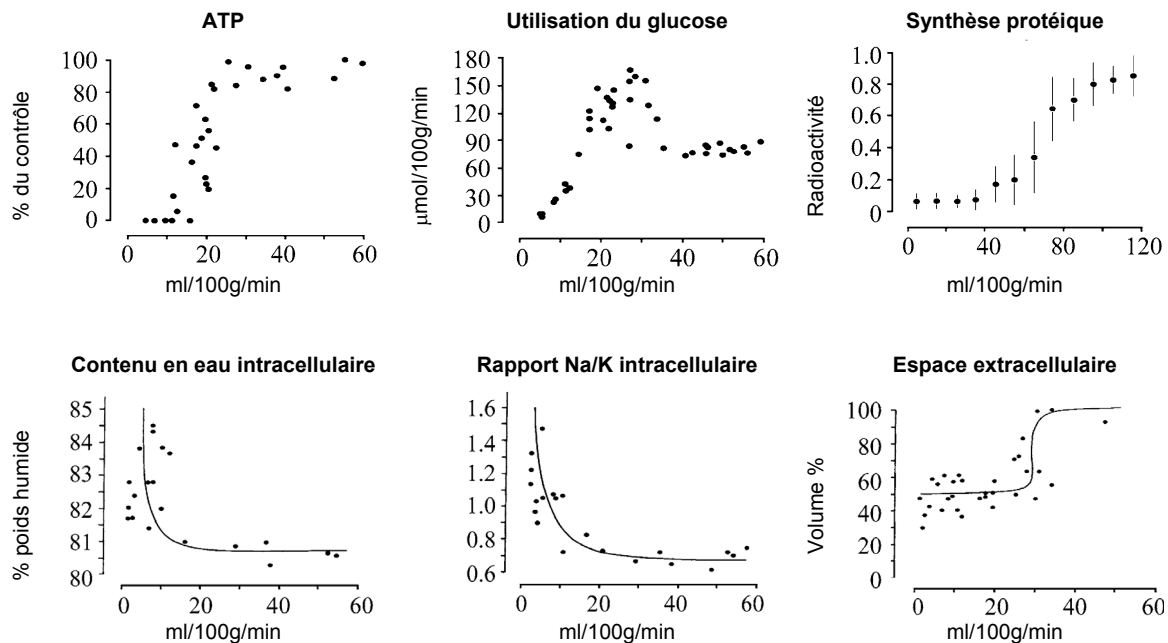


Figure 1.6 : Effets de l'ischémie cérébrale sur le métabolisme cérébral (haut), sur l'homéostasie ionique et le contenu en eau du cortex (bas) d'après Hossmann ⁹⁶.

1.2.3. Le concept de cœur et pénombre ischémique.

L'occlusion d'un vaisseau cérébral majeur induit une ischémie focale dans le territoire vasculaire correspondant. Les caractéristiques topographiques des lésions ischémiques consécutives dépendent en premier lieu de l'étendue, de la sévérité et de la durée du déficit de perfusion. L'étendue de l'ischémie est généralement déterminée par la distribution des vaisseaux sanguins collatéraux qui varie de façon interindividuelle chez l'homme et les animaux.

Au sein du foyer ischémique ou cœur ischémique, la diminution de perfusion est sévère et le DSC chute jusqu'à 20 % de sa valeur initiale correspondant au seuil dit «membranaire» ¹⁶. A ce niveau, les cellules sont incapables de maintenir un niveau d'ATP suffisant et perdent leur homéostasie ionique, conduisant à une dépolarisation anoxique et à la mort cellulaire. Chez le rat, cette valeur critique de débit en dessous de laquelle des infarctus constitués se produisent se situe aux alentours de 25 ml/100g/min pour la substance grise. Elle est de 10-12 ml/100g/min chez le primate et de 15 ml/100g/min chez le chat ¹⁴. La valeur critique chez le rat est plus élevée que chez les autres espèces probablement à cause d'une densité neuronale supérieure. Les rats spontanément hypertendus sont plus susceptibles à l'ischémie cérébrale que les rats normotendus puisqu'ils développent des infarctus en dessous

d'un DSC de 50 ml/100g/min. La raison de cette sensibilité tient probablement d'une circulation collatérale inadéquate.

A la périphérie du cœur ischémique se trouve une zone pour laquelle le DSC se situe entre le seuil membranaire et le seuil dit «fonctionnel» en dessous duquel la cellule perd son activité. Cette zone est appelée «pénombre ischémique» et correspond à un tissu sans activité électrique mais où la concentration en K^+ extracellulaire est maintenue, indiquant qu'il reste suffisamment d'énergie pour empêcher la dépolarisation anoxique. Ce seuil correspond à environ 40% du DSC de base soit 40-50 ml/100g/min chez le rat ¹⁶. Ce concept de pénombre ischémique a un intérêt clinique considérable puisque ce tissu est potentiellement viable mais contribue malgré tout au déficit neurologique. Ce tissu à risque peut potentiellement récupérer par reperfusion ou intervention pharmacologique ou être recruté progressivement par le foyer ischémique et contribuer ainsi au volume final de l'infarctus. Les raisons exactes de cette évolution ne sont pas entièrement connues mais pourraient impliquer des dépolarisations ischémiques ^{51, 216}. Ces dépolarisations sont associées à des mouvements massifs d'ions à travers les membranes accompagnés d'une chute du potentiel extracellulaire et suivis d'un œdème dû à l'accumulation d'eau intracellulaire. La restauration de la situation électrique normale implique une élévation du métabolisme énergétique cellulaire et conduit à une augmentation du DSC. Dans les aires ischémiques sévères, cette demande énergétique ne peut être satisfaite. Les perturbations ioniques et dépolarisations concomitantes deviennent permanentes (dépolarisation anoxique) et conduisent à des dommages tissulaires irréversibles.

1.2.4. Les mécanismes moléculaires des dommages ischémiques.

Bien que les mécanismes de mort cellulaire mentionnés dans ce paragraphe soient traités séparément, il faut souligner qu'aucun des ces mécanismes n'intervient de façon isolée mais qu'ils sont les principaux acteurs d'une cascade d'évènements complexe.

1.2.4.1. L'hypothèse excitotoxique.

Peu de temps après l'ischémie, des neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs sont libérés, résultant en une activation de leurs récepteurs spécifiques ¹⁷¹. Parmi eux, une attention particulière a été portée au glutamate, qui est connu pour être excitotoxique à forte concentration. Le glutamate active des récepteurs

membranaires couplés à des canaux ioniques (récepteurs ionotropiques) ou active des systèmes de second messenger (récepteurs métabotropiques). Les récepteurs ionotropiques sont classés en trois sous-types en fonction de leurs agonistes préférentiels : le récepteur α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), le récepteur kaïnate et le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA). L'activation des récepteurs glutamate ionotropiques induit un influx de Na^+ à l'intérieur de la cellule et une dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation entraîne un influx de Ca^{2+} par l'intermédiaire des récepteurs NMDA après levée du blocage exercé par le magnésium ou indirectement à travers des canaux calciques voltage-dépendant. Parallèlement, l'activation des récepteurs métabotropiques résulte dans l'activation de systèmes enzymatiques impliqués dans l'homéostasie calcique intracellulaire, conduisant à une élévation du Ca^{2+} intracellulaire (libération à partir du réticulum endoplasmique, des mitochondries ou de Ca^{2+} -"binding" protéines). Le Ca^{2+} active des protéases, lipases et endonucléases et favorise la production d'espèces oxygénées réactives (ROS), par exemple par l'intermédiaire de l'activation de nitrique oxyde synthases. Ces processus dévastateurs affectent directement l'intégrité cellulaire via la détérioration des protéines du cytosquelette et des membranes, la dégradation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et la formation de radicaux libres.

1.2.4.2. Formation de radicaux libres.

En condition normoxique, les ROS sont piégées par des enzymes anti-oxydantes comme les superoxyde dismutases, catalases et peroxydases ou par des piègeurs de radicaux endogènes comme l'acide ascorbique (vitamine C) ou l' α -tocophérol (vitamine E). Une déficience en oxygène et une réoxygénation tissulaire conduisent à une surproduction de ROS qui dépasse les mécanismes de défense cellulaire. Pendant l'ischémie, de grandes quantités de composés réduits (xanthine et hypoxanthine) se forment si l'adénosine n'est pas rephosphorylée en ATP) s'accumulent (stress réductif). Lors de la reperfusion, une augmentation soudaine de la quantité d'oxygène conduit à des réactions d'oxydation enzymatiques produisant des radicaux libres (stress oxydatif). L'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine produit l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Une ROS extrêmement toxique, le radical hydroxyl ($\cdot\text{OH}$), est alors formée à partir de H_2O_2 et $\text{O}_2^{\cdot-}$. Le rôle de l'oxyde nitrique (NO) dans l'ischémie cérébrale a bien été documenté^{9, 101}. Le NO est un radical libre produit par la NO synthase neuronale (nNOS) ou endothéliale (eNOS). D'un point de vue physiopathologique, le NO possède deux effets opposés : dans les cellules endothéliales, la production conduit à une

vasodilatation réduisant la souffrance hypoxique ⁹⁸ tandis que dans les neurones, le NO contribue à la formation du radical libre peroxy-nitrate en combinaison avec l'anion superoxyde ⁸⁶. Une forme inductible de la NOS (iNOS) a été mise en évidence dans l'ischémie cérébrale ¹⁹⁴. L'augmentation de l'activité de la iNOS intervient de manière retardée et est associée à des processus inflammatoires. La haute réactivité des radicaux libres conduit à des réactions en cascade endommageant les protéines, l'ADN, les phospholipides et conduisant finalement à la perte de l'intégrité cellulaire.

1.2.4.3. L'acidose lactique.

La principale cause de la diminution du pH pendant l'ischémie résulte d'un découplage entre la glycolyse et la phosphorylation oxydative. Par manque d'oxygène, le pyruvate ne peut pas être métabolisé par la voie normale et est converti en lactate. Il résulte de ce métabolisme anaérobie une surproduction d'ions H⁺ et donc une acidification tissulaire intracellulaire pouvant aller jusqu'à pH 6,5 à 6,7 ²³⁰. L'acidose aggrave les dommages tissulaires par différents mécanismes. Un pH intracellulaire bas inhibe la respiration mitochondriale, l'oxydation du lactate et l'extrusion des ions H⁺ et entretient donc le métabolisme anaérobie et l'acidification intracellulaire. Un autre mécanisme important implique la formation d'un œdème. Des concentrations élevées d'ions H⁺ activent l'antiport Na⁺/H⁺ qui entraîne l'extrusion d'H⁺ et l'influx de Na⁺. Ce dernier est accompagné de Cl⁻ et de molécules d'eau. La cellule régule ainsi son pH intracellulaire aux dépens de la régulation de son propre volume. Ce mécanisme intervient particulièrement dans le gonflement des cellules gliales.

1.2.4.4. La formation d'œdèmes.

Un modulateur important de la sévérité ischémique est l'œdème cérébral qui a été différencié en deux types différents par Klatzo et coll ¹¹⁷: un œdème précoce de type cytotoxique ou cellulaire suivi quelques temps plus tard par un œdème de type vasogénique.

L'œdème cellulaire est dépendant du seuil de DSC. Il débute quand le DSC atteint une valeur d'environ 30% du contrôle au moment où la stimulation du métabolisme anaérobie entraîne une augmentation de l'osmolarité intracellulaire et donc un gonflement cellulaire associé. Pour des DSC atteignant 20% de la valeur contrôle, la dépolarisation anoxique et l'équilibration des gradients ioniques à travers les membranes augmente encore l'osmolarité intracellulaire et le gonflement associé ⁹⁶.

En absence de DSC, le gonflement cellulaire se fait aux dépens du volume liquidien extracellulaire, conduisant à une rétraction du compartiment extracellulaire sans changement du contenu net en eau du tissu considéré¹³. Ce mouvement de liquide se reflète par la diminution du coefficient de diffusion apparent de l'eau que souligne l'augmentation de l'intensité de signal dans l'imagerie RMN pondérée en diffusion (DWI). Cependant, si un DSC résiduel persiste, de l'eau peut être captée à partir du sang et le contenu tissulaire net en eau peut augmenter. Un œdème cytotoxique d'une durée excédant quelques minutes est considéré comme un marqueur de dommages irréversibles. Cependant, il est en général accompagné de peu de changement du contenu net en eau et provoque un gonflement cérébral restreint. En pratique, il n'est donc pas considéré comme une cause majeure de détérioration clinique de l'état du patient⁹¹.

Avec la manifestation de la nécrose tissulaire 4 à 6 heures après le début de l'ischémie et en absence de reperfusion, la BHE se rompt et des protéines contenues dans le sérum commencent à passer du sang vers le tissu cérébral. Cette extravasation induit un gradient osmotique qui augmente le contenu en eau du tissu et conduit à un œdème de type vasogénique¹⁷⁸. Si l'IC est de taille importante, l'augmentation de volume causée par le tissu œdémateux peut être à l'origine d'un engagement et d'une compression cérébrale. En clinique, cette forme « maligne » de l'IC est la complication la plus dangereuse et représente une indication de craniotomie décompressive. Un chapitre ultérieur traitera plus en détails de l'œdème vasogénique et de la rupture de la BHE dans l'ischémie cérébrale.

1.2.4.5. Autres évènements physiopathologiques.

Les paragraphes précédents ont décrits les principaux processus induits par une ischémie cérébrale. Cependant, beaucoup d'autres phénomènes additionnels, délétères ou protecteurs, sont engendrés par l'ischémie. Il s'agit en particulier d'une diminution de la synthèse protéique, d'une réponse inflammatoire, d'une modification de la régulation et de l'expression de certains gènes. Ces processus ont été largement décrits dans la littérature^{96, 159, 227} et ne seront pas abordés dans cette thèse.

1.2.4.6. La mort cellulaire.

Après un épisode ischémique, la mort cellulaire peut survenir soit de manière aiguë et conduire alors à une nécrose, soit de manière retardée par activation de phénomènes apoptotiques (figure 1.7).

Les études histopathologiques menées sur le développement des lésions ischémiques ont montré des différences significatives dans les lésions induites par l'ischémie cérébrale permanente comparée à l'ischémie cérébrale transitoire ⁷². L'évolution caractéristique des dommages après une occlusion-reperfusion de l'ACM suit une séquence bien définie et fait apparaître une nécrose sélective neuronale (ou infarctus incomplet), plus importante dans le striatum que dans le cortex ¹⁵. Dans le striatum, le degré de nécrose neuronale est proportionnel à la durée de l'occlusion artérielle. A ce stade, des neurones nécrotiques rétrécis, festonnés et éosinophiles sont caractéristiques de dommages irréversibles et rencontrés dans les zones les plus sévèrement atteintes ⁷¹. Ces neurones sont entourés d'astrocytes gonflés mais intacts par ailleurs. Ce gonflement astrocytaire révèle possiblement une transition en astrocytes activés observés précocement après l'occlusion. La perte sélective des neurones est probablement due à leur plus grande vulnérabilité par rapport aux cellules gliales. Ils baignent en effet dans un microenvironnement où les concentrations interstitielles en neurotransmetteurs excitateurs, lactate, potassium et H^+ sont élevées et délétères. Ces infarctus incomplets sont caractérisés par une préservation de l'architecture tissulaire ¹⁴ et une absence de cavitation (zones de réabsorption des débris nécrotiques par les macrophages).

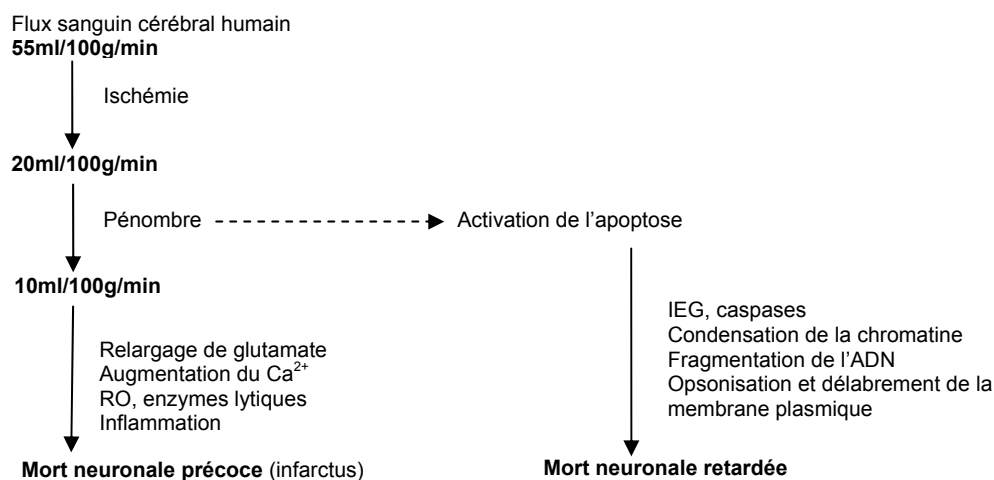


Figure 1.7 : Mécanismes conduisant à la mort neuronale au cours d'une ischémie cérébrale. RO : radicaux oxygénés, IEG : gènes de réponse immédiate, d'après Hakim ⁸³.

Dans l'ischémie cérébrale permanente au contraire, une nécrose ou infarctus complet (nécrose impliquant tous les types cellulaires) atteint à la fois les structures corticales et sous-corticales⁷³. Finalement, au stade chronique, le tissu nécrotique est résorbé par les cellules de la glie laissant la place à une cavité remplie de liquide. A l'opposé de la nécrose, un deuxième processus de mort cellulaire survient plus lentement dans le parenchyme cérébral, et de manière particulièrement évidente dans la région immédiatement adjacente à l'infarctus, c'est-à-dire dans la zone de pénombre ischémique. Ce processus de mort neuronale retardée, ou apoptose, fait entrer en jeu l'activation d'un programme de « suicide » cellulaire qui conduit d'abord à une désorganisation systématique du noyau et du cytosquelette puis à une condensation des neurones¹⁵⁹. Ce mécanisme de mort cellulaire retardée fait suite à l'expression de plusieurs gènes dont certains sont clairement délétères alors que d'autres peuvent avoir un effet neuroprotecteur voire réparateur. Immédiatement après l'agression qui provoque l'activation du phénomène apoptotique, la cellule apparaît souvent normale. Cependant, des modifications morphologiques particulières à ce processus surviennent : le cytoplasme se rétracte, les organelles cytoplasmiques se compactent, le réticulum endoplasmique se dilate, la membrane plasmique s'altère et la chromatine nucléaire se fragmente. Le temps d'apparition de ces différentes modifications varie suivant les modèles mais semble dépendre de la durée et de la sévérité de l'agression cellulaire.

Chapitre 2 : Modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale.

2.1. Modèles d'ischémie cérébrale.

La physiopathologie de l'ischémie cérébrale est complexe car la sévérité des dommages induits est modulée par des conséquences secondaires ou indirectes de l'atteinte ischémique primaire. Les perturbations à la reperfusion, les réponses de type stress, les changements oxydatifs ou l'activation de réponses génomiques sont quelques exemples des réponses moléculaires et hémodynamiques qui conditionnent la lésion finale. Un certain scepticisme a perduré pendant de nombreuses années sur la crédibilité et l'utilité des modèles de pathologies humaines sur petits animaux. Il semble que les chercheurs aient maintenant apporté une réponse appropriée au fil de leurs réflexions : les maladies humaines sont souvent aléatoires, sporadiques et variables dans leur occurrence mais leur complexité biochimique et moléculaire serait sans doute inaccessible sans le recours aux modèles animaux qui offrent une reproductibilité et une répétabilité essentielles aux scientifiques. Le génome des rongeurs est maintenant bien connu et présente une similitude remarquable avec celui de l'homme. L'apparition d'animaux mutants ou transgéniques permet l'étude ciblée du rôle du produit de certains gènes. L'interprétation des données expérimentales nécessite une connaissance approfondie des modèles et conditions expérimentales dans lesquelles les données ont été collectées. Le nombre et la diversité de ces modèles sont devenus très importants au fil des ans car les chercheurs ont recherché, souvent en vain, une approche idéale pour étudier l'ischémie et sa réversion thérapeutique. Un tel modèle doit refléter la situation clinique, être hautement reproductible, être dépourvu d'effet associé aggravant, et être facile à réaliser. Ce cahier des charges n'est pas encore facilement atteint, ce qui explique la recherche continue de nouvelles procédures expérimentales.

Au regard de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale, 3 catégories majeures de réduction du DSC sont distinguées : l'ischémie globale transitoire, le micro-embolisme et l'ischémie focale transitoire ou permanente. La revue de Hossmann⁹⁷ fournit une liste très détaillée de ces différents modèles et de leurs auteurs.

2.1.1. Ischémie globale transitoire.

2.1.1.1. Arrêt cardiaque.

Le modèle le plus représentatif de la situation clinique pour l'ischémie cérébrale globale est l'arrêt cardiaque. Il est produit par fibrillation ventriculaire, injection

intracardiaque d'agents cardioplogiques, asphyxie, exsanguination, noyade ou compression intrathoracique. L'animal est ensuite ressuscité par réanimation cardio-pulmonaire. Dans ce modèle, l'arrêt cardio-respiratoire n'affecte pas seulement le cerveau mais aussi tous les autres organes, ce qui peut interférer avec la récupération post-ischémique.

2.1.1.2. Ischémie cérébrale complète.

Ces modèles sont réalisés par compression des vaisseaux sanguins au niveau du cou par strangulation ou gonflement d'une manchette pneumatique, par occlusion des artères sous-clavières intra-thoraciques, ou par augmentation de la pression intracrânienne en infusant du liquide à haute pression dans la cisterna magna. Dans tous ces modèles d'arrêt cérébrocirculatoire sélectif, des précautions doivent être prises pour supprimer toute circulation collatérale au cerveau ischémique. Ceci est réalisé par occlusion des artères ptérygopalatines, par drainage rétrograde des vaisseaux occlus ou par diminution de la pression artérielle par hémorragie ou application d'agents pharmacologiques. Malgré leur facteur pathogénique commun, ces modèles présentent des différences physiopathologiques considérables. Par exemple, quand l'apport sanguin artériel est interrompu sans blocage simultané du circuit veineux, la majorité du sang est extrait du cerveau pendant l'ischémie conduisant à une ischémie anémique. Au contraire, l'interruption additionnelle du circuit veineux pendant la strangulation conduit à une ischémie hyperémique avec congestion massive de la vascularisation cérébrale. Cette différence est importante lors de la reperfusion puisque l'augmentation de viscosité du sang stagnant nécessitera une pression de reperfusion plus importante dans le modèle de strangulation par rapport à l'ischémie anémique.

2.1.1.3. Ischémie cérébrale incomplète.

L'ischémie cérébrale incomplète (ou oligémie) est produite par ligature extracrânienne des artères carotides et vertébrales ou par diminution de la pression artérielle en combinaison avec une occlusion bilatérale des carotides. Elle produit des régions oligémiques spatialement étendues et qui ont la particularité d'avoir un DSC diminué mais un métabolisme énergétique normal. Ce modèle est donc particulièrement favorable à l'étude de ces zones d'intérêt, qui peuvent évoluer vers l'infarctus et constituent donc une cible thérapeutique de choix. La technique est particulièrement adaptée à la gerbille chez qui il suffit de ligaturer les deux artères

carotides puisque le polygone de Willis est incomplet et qu'aucune connexion entre l'artère basilaire et l'artère carotide interne ne permet de suppléance. Un facteur à prendre en compte dans ce modèle est la lente perfusion des vaisseaux pendant la période ischémique. Cette perfusion résiduelle entraîne un gonflement cellulaire et une compression de la microcirculation qui peut compromettre la reperfusion. Ce facteur est probablement une des raisons pour lesquelles ce modèle cause plus de dommages qu'un modèle d'ischémie complète.

2.1.1.4. Modèle d'ischémie *in vitro*.

Ces modèles se sont récemment développés dans la recherche sur l'ischémie. Ils consistent à cultiver des neurones ou des coupes de tissu cérébral et à les incuber dans un milieu dépourvu de glucose et désoxygéné afin de mimer l'ischémie. Ces modèles ont plusieurs inconvénients majeurs. La préparation des coupes est traumatique et associée à une période d'ischémie avant l'incubation dans le milieu adéquat. Ceci est particulièrement vrai dans le cas de l'hippocampe chez qui quelques minutes d'ischémie entraîne des dommages irréversibles. De plus, ces préparations *in vitro* ont un environnement extracellulaire différent des conditions *in vivo* puisque le milieu d'incubation fournit des solutés extracellulaires comme le Ca^{2+} et le Na^+ en quantité illimitée. Les données issues de ces modèles ont peu de caractéristiques communes avec la situation *in vivo* et doivent être interprétées avec précaution.

2.1.2. Micro-embolisme.

Bien que cette pathologie ne soit pas prépondérante en clinique, plusieurs modèles ont été développés pour étudier cette situation particulière. La méthode la plus employée est l'injection intracarotidienne de microsphères calibrées. D'autres consistent à injecter des bulles d'air dans la carotide, à infuser de l'adénosine diphosphate (ADP), de l'acide arachidonique ou à induire une agrégation plaquettaire. Une différence physiologique importante entre le micro-embolisme et les autres formes d'ischémie est la rupture immédiate de la BHE, probablement à cause d'une irritation des parois vasculaires et non suite à l'évènement ischémique lui-même. Une autre particularité est le développement d'une hyperémie réactive multifocale entourant les microvaisseaux occlus. Ceci conduit à un gonflement soudain du cerveau et à une distribution extrêmement inhomogène de la microcirculation avec de très hauts et très bas débits.

2.1.3. Ischémie focale transitoire ou permanente.

2.1.3.1. Craniectomie et électrocoagulation de l'ACM.

Ce modèle a été initialement développé par Tamura et coll²⁰⁹ et consiste à exposer et électrocoaguler l'ACM après dissection du muscle temporal et craniectomie. Les infarctus produits impliquent le cortex fronto-pariétal et peuvent s'étendre dans les zones sous-corticales. Ils représentent environ 20% du volume hémisphérique. Les zones de cœur ischémique et de pénombre sont facilement identifiables avec ce modèle et il est très reproductible pour une souche de rat donnée. Modèle non réversible, il est très invasif et nécessite une bonne habileté chirurgicale pour éviter d'endommager le cortex en exposant l'artère et en disséquant la dure-mère. Bien que les dommages n'atteignent généralement pas le lobe temporal, les animaux ne peuvent pas être testés pour les dysfonctions mémorielles. Une variante de ce modèle consiste à poser un clip ou une suture sur l'artère, permettant ainsi d'effectuer une reperfusion. Ce modèle est finalement couramment utilisé.

2.1.3.2. Occlusion photothrombotique.

Dans ce modèle, un agent photosensible (colorant rose Bengale), est infusé en intraveineux. Une illumination du cortex ou d'une portion de l'ACM à l'aide d'une source laser provoque la coagulation de la partie irradiée. Ce modèle est hautement reproductible mais n'est plus très utilisé. Il produit un infarctus bien délimité mais reste très invasif comme le modèle par électrocoagulation.

2.1.3.3. Modèle auto-embolique.

Ce modèle consiste en la préparation d'un caillot sanguin veineux autologue. Ce caillot primaire est ensuite coupé en particules micro-emboliques qui sont injectées dans l'artère carotide interne distale produisant des infarctus multiples ou simples en fonction du nombre et de la taille des emboles injectés. Ce modèle est certainement plus physiologique que d'autres puisqu'il simule une occlusion artérielle à l'aide d'un véritable caillot endogène. Il permet en outre l'étude d'agents thrombolytiques. Il a cependant quelques points critiquables, notamment une faible reproductibilité dépendante de la taille de l'embolie et une variation de la localisation de l'infarctus.

2.1.3.4. Injection intracérébrale d'endothéline.

Ce modèle implique l'injection intracérébrale directe d'agents hautement vasoconstricteurs que sont l'endothéline 1 ou 3. Ces deux composés provoquent un vasospasme sévère et une thrombose éventuelle des artères adjacentes. Ce modèle est rarement utilisé car il est très invasif et entraîne des dommages cérébraux directs provoqués par l'injection intracérébrale.

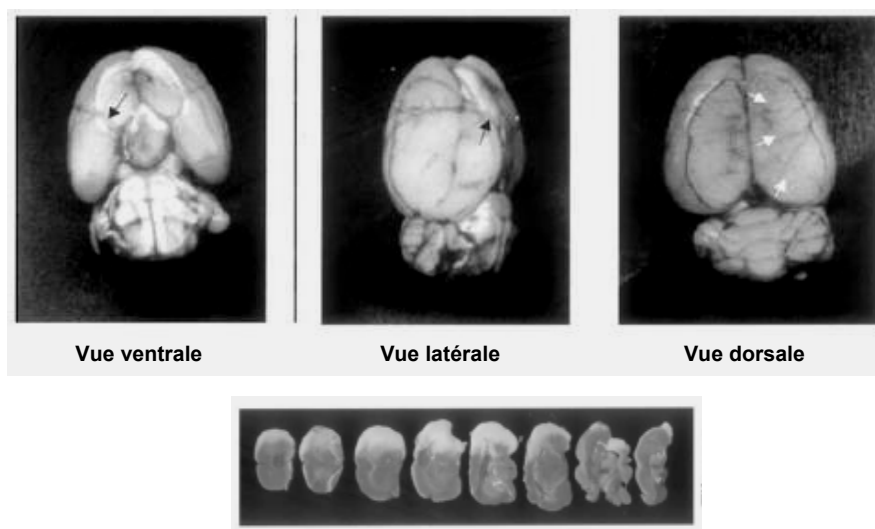
2.1.3.5. Occlusions vasculaires extracrâniennes.

Les difficultés techniques rencontrées dans les modèles d'occlusion intracrânienne ont entraîné le développement de modèles d'ischémie cérébrale focale par occlusion de l'artère carotide commune. Cependant, dans la plupart des espèces, cette occlusion ne suffit pas à produire d'ischémie car le polygone de Willis fournit suffisamment de sang à partir des autres artères non occluses. Les seules exceptions sont la gerbille chez qui le polygone de Willis est incomplet, la chèvre chez qui les artères vertébrales ne s'unissent pas pour former l'artère basilaire et le rat spontanément hypertendu qui présente un système collatéral défectueux. Chez les autres espèces, des interventions chirurgicales compliquées supplémentaires doivent être réalisées. C'est le cas chez le rat où l'occlusion de l'artère carotide est combinée avec une hypertension intracrânienne ou avec une anastomose entre la carotide controlatérale et la veine jugulaire pour réduire la perfusion collatérale. Une autre manière d'améliorer l'impact ischémique suite à une occlusion extracrânienne est de la combiner avec une hypoxie respiratoire ou un empoisonnement au monoxyde de carbone.

2.1.3.6. Occlusion intraluminaire de l'ACM.

Ce modèle, initialement développé par Koizumi et coll ¹²¹, a été modifié par Longa et coll ¹³³ et est probablement le modèle expérimental d'ischémie le plus largement employé. Un dispositif occlusif constitué d'un fin fil de nylon épaissi à son extrémité est introduit dans la carotide externe et guidé jusqu'à l'origine de l'ACM pour y interrompre le débit sanguin. Ce modèle montre plusieurs avantages : il ne nécessite pas de craniectomie et est facilement réversible pour induire une ischémie focale transitoire. Le placement du filament peut être effectué à distance ce qui permet des enregistrements électrophysiologiques continus voire l'acquisition de données d'IRM ¹²⁹. Cette approche a initialement été développée chez le rat mais

son adaptation chez la souris est également possible ⁸⁹. Le modèle conduit au développement de gros infarctus (figure 2.1) impliquant des aires corticales et sous corticales et atteignant 35 à 40% du volume hémisphérique ^{89, 119, 160}.



Coupes coronales de cerveau colorées mettant en évidence la zone ischémique en blanc

Figure 2.1 : Observation macroscopique d'une ischémie du territoire de l'ACM droite chez le rat après injection de Bleu d'Evans. Les flèches noires indiquent l'origine de l'ACM. Les flèches blanches délimitent le territoire ischémique. D'après Yang et coll ²³².

Les lobes frontaux, pariétaux et temporaux sont impliqués ce qui permet la quantification des déficits induits par la réalisation de tests comportementaux ^{24, 25}. La reproductibilité de ce modèle est très variable et de nombreux facteurs y contribuent : l'enrobage ou non du filament (silicone, poly-L-lysine) ^{25, 208}, le diamètre du filament ³, la méthode d'anesthésie ⁸², le contrôle des paramètres physiologiques ⁷⁸, l'âge et le poids de l'animal, la souche de l'animal et son élevage de provenance ¹⁶⁰, l'anatomie cérébro-vasculaire ⁶⁸ et la technique chirurgicale utilisée (ligature ou non d'autres artères) ⁵⁵. Bien que la technique permette d'occlure l'ACM proximale, la suture reste parfois dans la partie distale de la carotide interne (n'entraînant pas d'ischémie) ou bien avance dans l'artère cérébrale antérieure proximale avec un risque d'hémorragie sous-arachnoïdienne ou intracérébrale ¹⁹⁰. La mesure du DSC par laser doppler assure un positionnement correct du filament et permet de réduire ce risque. Les désavantages de cette technique sont la difficulté à positionner précisément le filament, le risque de lésion vasculaire et la grande étendue des infarctus si le dispositif occlue l'origine de l'ACM et de l'artère cérébrale antérieure. Enfin, la mortalité de ce modèle n'est pas négligeable à cause du volume important de l'infarctus induit et de l'œdème l'accompagnant. Ce paramètre nécessite

d'augmenter le nombre d'animaux pour une étude donnée. Il est finalement utile de rappeler que les infarctus chez l'homme sont souvent plus restreints à cause d'un site d'obstruction de l'ACM plus distal.

2.1.4. Modèle d'ischémie cérébrale *in-silico*.

Des modèles mathématiques prenant en compte les différents paramètres physiopathologiques impliqués dans l'ischémie cérébrale sont actuellement développés^{56, 58}. Ils sont alimentés par les nombreuses données physiologiques collectées dans les études *in vitro* et *in vivo* chez l'homme et l'animal, et intègrent les mécanismes tissulaires, cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement de la pathologie ischémique. Leur but est de prédire les interactions entre les différents mécanismes mis en jeu ainsi que leurs influences respectives sur les dommages ischémiques. Ces expériences *in silico* devraient permettre d'explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques et peut-être d'expliquer les échecs des essais cliniques rencontrés avec les neuroprotecteurs. Même si ces modèles paraissent très éloignés de la clinique, ils ont le mérite d'être tout à fait reproductibles et éthiques et ont déjà fourni des résultats encourageants, proches des observations faites par imagerie médicale après une occlusion artérielle permanente ou transitoire.

2.2. Choix et mise au point du modèle d'ischémie pour les études de cette thèse.

Le modèle animal choisi pour les études de cette thèse est le modèle d'occlusion intraluminaire de l'ACM chez le rat. Plusieurs critères ont pondéré ce choix :

1. Un modèle d'ischémie cérébrale focale, afin de correspondre au plus juste à la pathologie humaine la plus répandue.
2. Un modèle d'infarctus du territoire de l'ACM, correspondant aux infarctus cérébraux de l'artère sylvienne rencontrés dans 70% des cas d'infarctus carotidiens chez l'homme.
3. Un modèle d'ischémie cérébrale transitoire, permettant l'étude de la reperfusion spontanée ou pharmacologiquement induite chez l'homme.
4. Un modèle peu invasif permettant éventuellement un réveil des animaux pour des études de suivi dans le temps.
5. Un modèle dont la topographie lésionnelle permet la réalisation et l'exploitation de tests neurologiques.

6. Un modèle techniquement adapté aux études par IRM (reperfusion induite alors que l'animal est en place dans l'aimant).

L'apprentissage de la technique chirurgicale m'a été dispensé par Hélène Seegers au cours de sa thèse dans le laboratoire ¹⁹³. Cependant, grâce aux précieux conseils et l'expérience de Simon Roussel sur cette technique, plusieurs modifications nécessaires à l'amélioration de l'efficacité et de la reproductibilité de ce modèle ont été apportées (re-calibration de l'embout du filament, redéfinition du repère porté par le filament, changement de méthode de fabrication des filaments).

2.2.1. Confection du filament occlusif.

Le mode de confection du filament a un impact décisif sur le succès d'occlusion. Cette étape est donc réalisée avec le plus grand soin. Plusieurs types de filaments ont été testés au laboratoire : fil de suture en polyamide ou nylon, fibres optiques, de diamètres variables, munis d'un embout émoussé à la flamme ou réalisé en résine moulée, enrobés de poly-L-lysine ou non. Ces différents filaments ont été testés sur l'animal et ont conduit à une grande variabilité dans la réussite du modèle. Un filament trop rigide a des difficultés à passer la bulle tympanique. L'émoussage du filament à la flamme conduit à la formation d'une boule plutôt qu'un cylindre. Cette forme de l'extrémité du filament oblige à une très grande précision dans le placement de l'embout en face de l'origine de l'ACM et a tendance à réduire le taux de succès. L'enrobage de poly-L-lysine (permettant une meilleure adhérence de l'embout aux parois de l'artère) n'a pas permis d'augmenter le taux de succès par rapport à un filament non enrobé. Finalement, les contraintes techniques de rigidité du fil et la facilité de mise en œuvre ont abouti à la réalisation d'un filament en fil de pêche de diamètre 0,20 mm (La tortue nacrita n°20, Les Andelys, France) muni d'un manchon en colle thermofusible rendue liquide par chauffage (référence 220-9883, Radiospares, Beauvais, France) (figure 2.2). Le manchon ainsi constitué (figures 2.3), d'une longueur de 2 mm et d'un diamètre de 0,38 mm (déterminé après calibration, voir paragraphe 2.2.2), permet l'occlusion complète de l'origine de l'ACM sans interrompre le flux amont dans l'artère carotide interne.

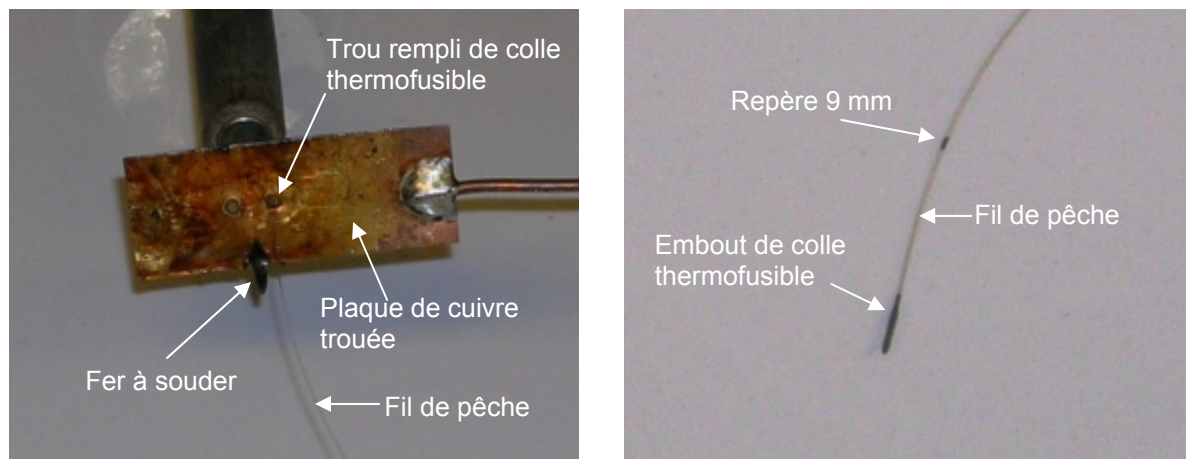


Figure 2.2: Photos montrant à gauche le dispositif servant à confectionner les filaments et à droite, un filament fini.

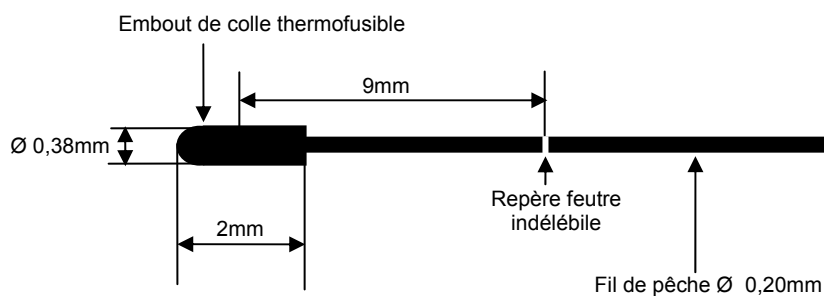


Figure 2.3 : Schéma du filament occlusif.

Après refroidissement, le diamètre, la longueur et la régularité du manchon sont soigneusement vérifiés à l'aide d'un micromètre sous loupe binoculaire. Tout filament ne correspondant pas aux dimensions définies ou présentant des aspérités risquant de léser les cellules endothéliales lors de son passage contre la paroi artérielle est systématiquement rejeté. Un repère de couleur foncée est effectué au feutre indélébile sur le fil de pêche. Il permet de positionner l'embout du filament au niveau de l'origine de l'ACM qui se situe à l'intérieur du crâne et n'est pas visible directement. Initialement, ce repère était tracé sur le fil de pêche à 2 cm du milieu du manchon de colle, ce qui correspond à la distance entre l'origine de l'ACM et la bifurcation carotidienne. Cependant, cette distance présente une variabilité interindividuelle et ne garantit pas le meilleur succès d'occlusion. Le repère a donc été modifié et repositionné à 9 mm du milieu du manchon de colle, ce qui correspond à la distance physiologiquement invariable entre l'origine de l'ACM et la bulle tympanique. Suite à cette modification, quelques animaux ont subi une autopsie afin

de vérifier le placement correct de l'embout de colle en face de l'origine de l'ACM (figure 2.4).

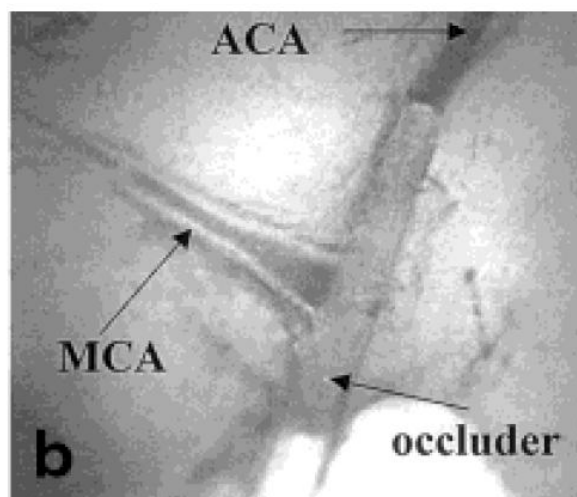


Figure 2.4 : Examen post-mortem de la position de l'embout occlusif à la surface ventrale du cerveau. ACA : artère cérébrale antérieure ; MCA : artère cérébrale moyenne. D'après Lythgoe et coll¹³⁸.

2.2.2. Calibration du diamètre des filaments.

La mise au point du modèle d'ischémie a nécessité une calibration du diamètre du filament pour réaliser l'occlusion de l'ACM dans nos conditions expérimentales en fonction de la souche et du poids des animaux utilisés.

Le diamètre du filament doit être choisi de façon adéquate afin de passer aisément la barrière de la bulle tympanique et de se positionner au mieux à l'origine de l'ACM sans provoquer de rupture de la paroi artérielle.

5 rats mâles Sprague-Dawley OFA (Janvier, Le Genest St Isle, France) de poids compris entre 300 et 350 g ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale (IP) de 0,4 g/kg de choral hydrate 4% (Sigma-Aldrich, Lyon, France) et laissés en respiration spontanée. Leur température corporelle a été mesurée et maintenue à 37 °C grâce à une sonde rectale reliée à une couverture chauffante (Harvard Apparatus, Holliston, USA).

Une série de filaments de différents diamètres (0,36, 0,38, 0,40 et 0,42 mm) a été confectionnée et testée sur chacun des rats (tableau 2.1).

Le filament de plus gros diamètre a été testé. Si il bloque à l'entrée de la bulle tympanique, un filament de diamètre inférieur est testé et ainsi de suite jusqu'à trouver le diamètre passant aisément à travers la bulle de tous les rats.

∅ manchon	Situation	Rat 1 (350g)	Rat 2 (320g)	Rat 3 (350g)	Rat 4 (340g)	Rat 5 (340g)
0,42 mm	<i>Manchon dépasse BT</i>	N	N	O	O	O
	<i>Repère bloque avant BT</i>	NT	NT	O	O	O
	<i>Repère atteint BT</i>	NT	NT	NT	NT	NT
	<i>Repère dépasse BT</i>	NT	NT	NT	NT	NT
0,40 mm	<i>Manchon dépasse BT</i>	O	O	O	O	O
	<i>Repère bloque avant BT</i>	O	O	N	N	N
	<i>Repère atteint BT</i>	N	N	O	O	O
	<i>Repère dépasse BT</i>	N	N	N	N	N
0,38 mm	<i>Manchon dépasse BT</i>	O	O	O	O	O
	<i>Repère bloque avant BT</i>	N	N	N	N	N
	<i>Repère atteint BT</i>	O	O	O	O	O
	<i>Repère dépasse BT</i>	O	O	O	O	O
0,36 mm	<i>Manchon dépasse BT</i>	NT	NT	NT	NT	NT
	<i>Repère bloque avant BT</i>	NT	NT	NT	NT	NT
	<i>Repère atteint BT</i>	NT	NT	NT	NT	NT
	<i>Repère dépasse BT</i>	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Diamètre retenu</i>		0,38	0,38	0,40	0,40	0,40

Tableau 2.1 : Calibration du diamètre des filaments occlusifs. O : oui ; N : non ; NT : non testé ; BT : bulle tympanique.

Puis, pour ce filament en question, plusieurs situations ont été rencontrées :

1. Il a été avancé au maximum dans l'ACI et a bloqué alors que le repère 9 mm n'avait pas atteint la bulle tympanique : le manchon de colle était trop gros pour permettre l'occlusion de l'ACM.
2. Il a été avancé au maximum dans l'ACI et a bloqué alors que le repère 9 mm se situait au niveau de la bulle tympanique : le manchon de colle était en position idéale pour permettre l'occlusion de l'ACM.
3. Il a été avancé au maximum dans l'ACI et le repère 9 mm a dépassé la bulle tympanique : le manchon de colle était entré dans l'ACA (susceptible de provoquer une hémorragie par rupture de la paroi vasculaire) et l'ACM n'était pas occluse.

Pour garantir le succès d'occlusion, la majorité des manchons de colle devaient se placer juste au niveau de l'origine de l'ACM, sans avoir à forcer le positionnement pour ne pas risquer de léser l'artère. Dans nos essais, cela impliquait que le repère situé sur le filament à 9 mm du milieu du manchon atteigne la bulle tympanique. Ce

critère a été rempli pour tous les rats pour un diamètre de 0,38 mm. Pour 3 rats sur 5, le diamètre retenu était de 0,40 mm. Cependant, pour ces rats, le filament ne pouvait pas avancer plus loin dans l'ACI et ce diamètre ne nous aurait pas laissé beaucoup de marge de manœuvre pour des rats de plus petits poids comme ceux que nous utilisons dans le modèle d'ischémie (280 – 350 g).

Suite à la calibration du diamètre du filament, une série de 16 rats mâles a subi une occlusion de l'ACM avec le filament de 0,38mm de diamètre pour s'assurer de la reproductibilité du modèle. Le taux de succès (présence d'une ischémie striatale ou cortico-striatale) a été vérifié en histologie par coloration au chlorure de 2,3,5-triphényl tétrazolium (TTC). Des coupes de cerveau frais ont été incubées à 37°C dans une solution de TTC à 4%. Dans le tissu sain, le formazan du TTC a été réduit par les déshydrogénases tissulaires en un composé de couleur rouge. Dans le tissu lésé (ischémie), les déshydrogénases étaient inactives et le formazan est resté incolore (figure 2.5).

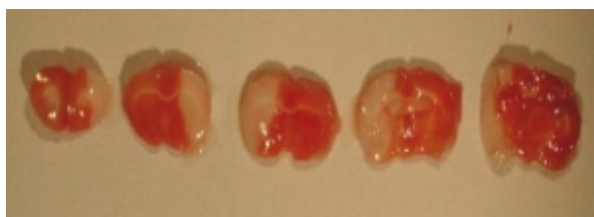


Figure 2.5 : Vérification du succès de l'occlusion de l'ACM par coloration au TTC sur tissu frais. Le tissu sain est coloré en rouge tandis que la zone ischémisée reste blanche.

Sur les 16 animaux testés, 13 ont montré des signes de dommages ischémiques au TTC (11 atteintes cortico-striatales et 2 atteintes striatales), correspondant à un taux de succès de 81%.

2.2.3. Procédure opératoire détaillée.

L'animal est en décubitus dorsal et une entaille longitudinale de la peau au niveau de la trachée est réalisée. La bifurcation carotidienne (artère carotide commune (ACC), artère carotide externe (ACE) et ACI) est dégagée d'entre les muscles péri-trachéaux et le muscle sterno-mastoïdien (figure 2.6a).

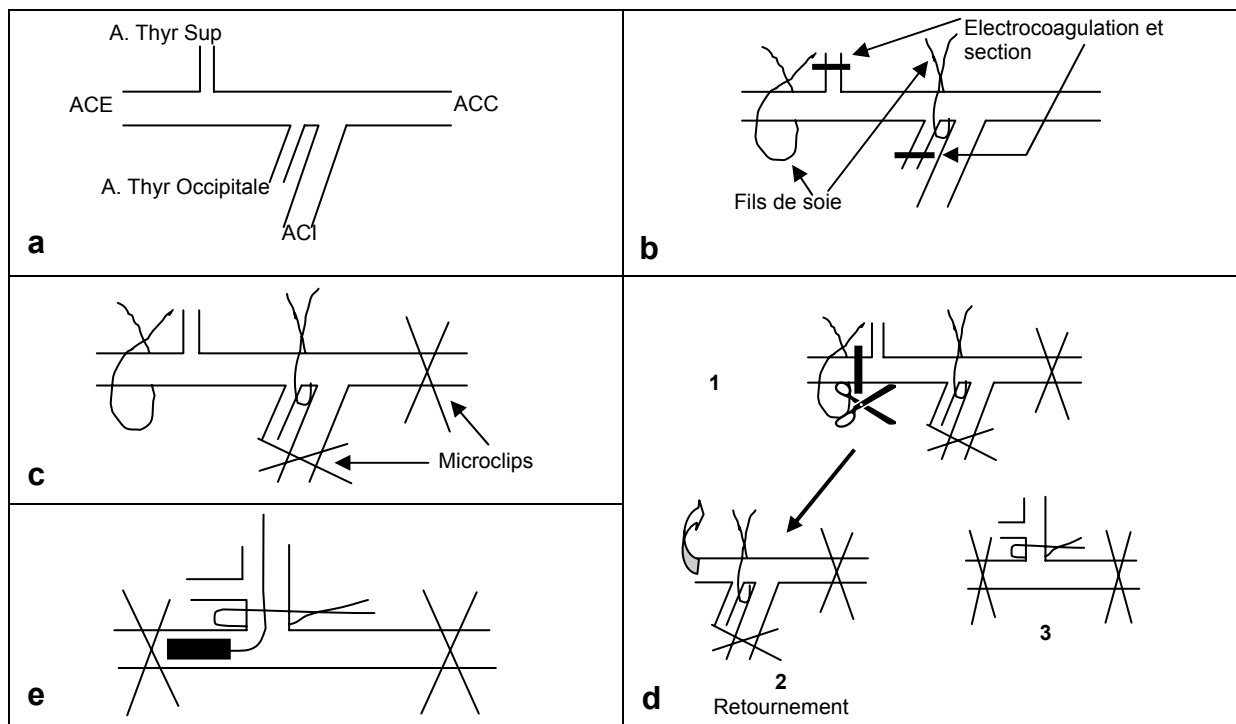


Figure 2.6 : Représentation schématique des différentes étapes de l'occlusion intraluminaire de l'artère cérébrale moyenne. A. Thyr Sup : artère thyroïdienne supérieure ; A. Thyr Occipitale : artère thyroïdienne occipitale ; ACE : artère carotide externe ; ACC : artère carotide commune ; ACI : artère carotide interne.

L'ACE, l'origine de l'ACI et la zone où l'ACI entre dans la bulle tympanique sont disséquées. L'ACE distale est ligaturée, les artères thyroïdiennes supérieure et occipitale sont électrocoagulées et sectionnées. Un fil de soie est passé entre l'artère thyroïdienne occipitale et la carotide interne (figure 2.6b). Un microclip vasculaire est positionné sur l'ACC et un autre sur l'ACI (figure 2.6c). Le filament occlusif est alors inséré dans le lumen de l'ACE sectionnée. Le moignon de l'ACE est ensuite aligné avec l'ACI (figure 2.6d), permettant au filament d'être poussé dans l'ACI jusqu'à ce qu'un repère situé sur le filament à 9mm de son extrémité soit positionné au niveau de la bulle tympanique (figure 2.6e). L'embout de colle du filament se retrouve alors au niveau de l'origine de l'ACM, interrompant ainsi le débit sanguin dans celle-ci (figure 2.7). A la fin de l'intervention, des points de suture sont réalisés pour refermer la peau du cou. Suivant ce protocole, le dispositif occlusif est inséré dans l'ACI via l'ACE de façon à ce que le débit sanguin dans l'ACI ne soit pas interrompu.

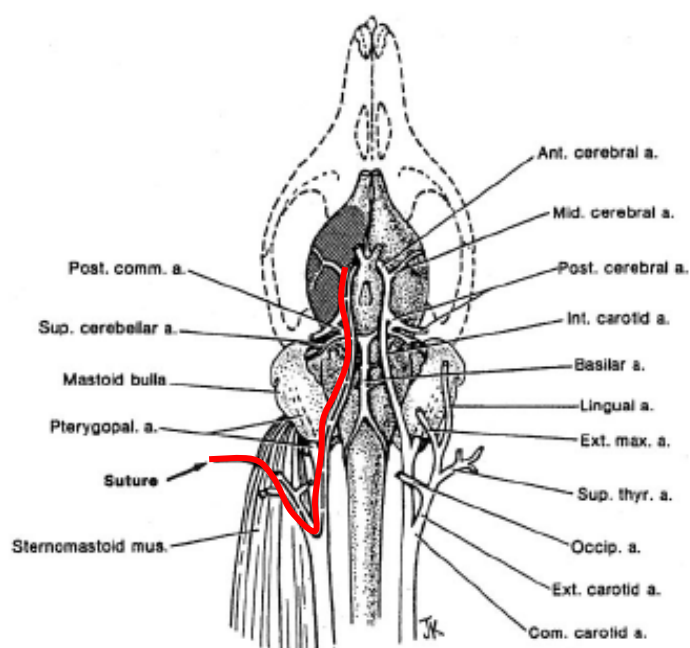


Figure 2.7 : Représentation schématique de la technique d'occlusion intraluminaire. D'après Longa et coll¹³³. Ant : antérieure ; Mid : moyenne ; Post : postérieure ; Int : interne ; Comm : communicante ; Sup : supérieure ; Thy : thyroïde ; Occip : occipitale ; Com : commune ; a : artère.

2.2.4. Reperfusion.

Après réouverture des points de suture au niveau du cou, la reperfusion est obtenue en retirant manuellement le filament occlusif de 10 mm environ, de façon à ce que l'embout de colle se positionne dans l'ACI juste en amont de la bulle tympanique. Cette configuration permet la restauration du DSC dans l'ACM tout en empêchant le saignement qui pourrait se produire lors d'un retrait complet du filament. L'extrémité du fil de pêche est coupée au niveau de son entrée dans l'ACE puis la peau de l'animal est recousue.

**Chapitre 3 : Etude de la perméabilité de la barrière
hémato-encéphalique au cours de l'ischémie
cérébrale transitoire chez le rat.**

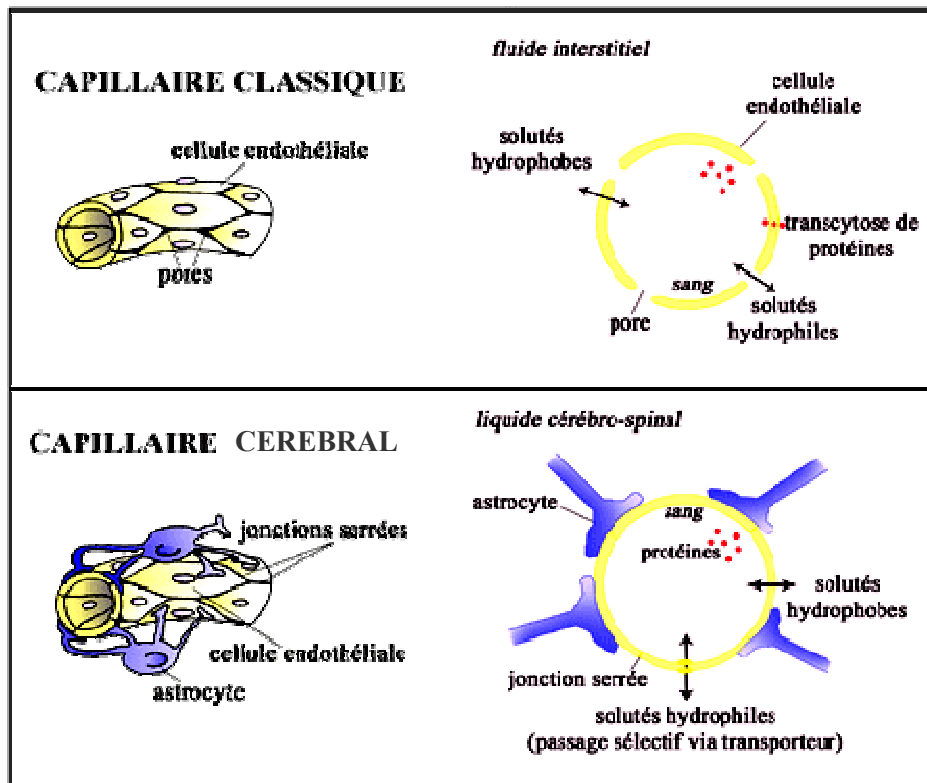
3.1. Introduction bibliographique.

3.1.1. Définition et constitution de la barrière hémato-encéphalique.

Le concept d'une barrière anatomique isolant chimiquement le cerveau de la circulation sanguine s'est progressivement imposé au tournant du XX^e siècle, lorsque différents physiologistes (Ehrlich en 1885, Biedl et Kraus en 1898, Lewandowsky en 1900 et Goldmann en 1909) découvrirent que les colorants vitaux administrés par voie intraveineuse à des animaux d'expérience épargnaient le tissu cérébral, alors que celui-ci fixait les mêmes pigments injectés par voie sous-arachnoïdienne. Par la suite, les travaux de plus en plus précis des neuroanatomistes démontrèrent l'existence d'une série de feuillets séparant rigoureusement le cerveau du flux sanguin, tout au long de l'arborescence vasculaire. Le terme de BHE sera introduit en 1921 par Stern et Gaultier.

La BHE est une barrière de filtration sélective essentielle au fonctionnement normal du système nerveux central (SNC). Elle contrôle le passage des substances sanguines du sang vers le SNC et l'isole ainsi du reste de l'organisme en lui permettant de conserver un milieu spécifique. La BHE est présente dans toutes les régions cérébrales excepté dans les organes circum-ventriculaires incluant l'area postrema, l'éminence médiane, la neurohypophyse, la glande pinéale, l'organe sub-fornical et la lame terminale ¹⁷. Les vaisseaux sanguins dans ces régions possèdent des fenestrations qui permettent la diffusion de molécules entre le sang et le liquide céphalo-rachidien. Ces aires non protégées du cerveau régulent le système nerveux autonome et les glandes endocrines du corps.

La BHE est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales, d'une lame basale, de péricytes et d'astrocytes. Les cellules endothéliales diffèrent morphologiquement de celles du reste du corps par l'absence de canaux transendothéliaux, la présence de jonctions serrées étanches ou *zonula occludens* et la rareté des vésicules de pinocytose (figure 3.1). Les jonctions serrées sont les éléments les plus apicaux du complexe fusionnel entre les cellules endothéliales. A ce jour, il a été identifié 3 protéines transmembranaires constitutives de ces jonctions : l'occludine, la claudine et la molécule d'adhésion des jonctions (JAM). D'autres protéines cytoplasmiques (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) sont associées aux jonctions serrées et auraient un rôle dans le maintien de la cohésion cellulaire.



Capillaires classiques et capillaires cérébraux

Figure 3.1 : Différences morphologiques entre capillaires classiques et capillaires cérébraux. Image issue du site internet du club de la BHE (<http://club.bhe.free.fr>).

Les jonctions serrées sont toujours situées près d'une seconde zone de contact appelée jonction adhérente ou *zonula adherens*, constituée de protéines transmembranaires de la famille des cadhérines et d'un groupe de protéines cytoplasmiques appelées caténines (figure 3.2).

Les cellules des capillaires cérébraux génèrent une membrane basale qui a une structure trilamélaire et dont les composants principaux sont le collagène de type IV, les laminines et l'héparine sulfate protéoglycane. Outre sa fonction de barrière sélective et son support physique aux cellules, elle interviendrait dans certaines régulations biologiques comme la croissance cellulaire, la différenciation, la migration et la réparation tissulaire⁴³. Sa charge négative, donnée par les protéoglycanes, pourrait intervenir dans la filtration de protéines anioniques. Son altération pourrait expliquer la perméabilité de la BHE aux érythrocytes et le développement de complications hémorragiques au cours de l'ischémie cérébrale¹⁶⁹.

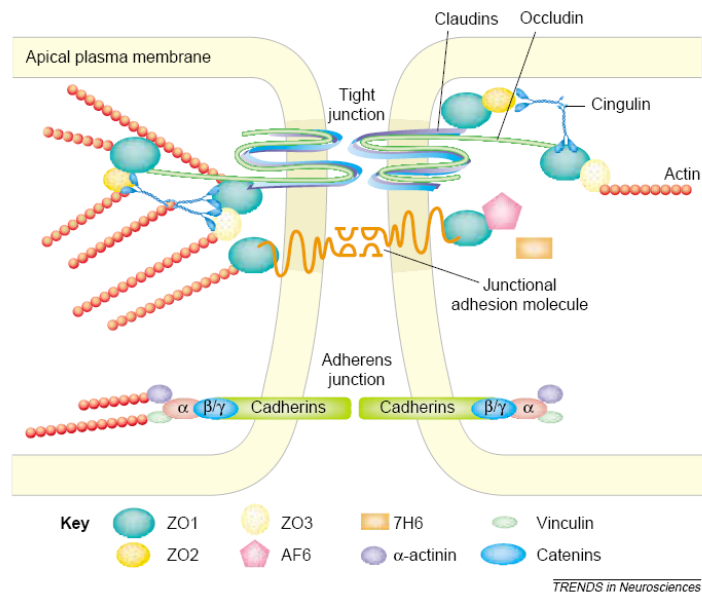


Figure 3.2 : Interactions des principales protéines associées aux jonctions serrées. D'après Huber et coll 100

Les péricytes sont des constituants importants de la BHE et sont intimement liés aux cellules endothéliales. Ils interviennent dans le développement du réseau vasculaire en contrôlant la croissance endothéliale par inhibition de contact. Ils contribuent à la formation de la membrane basale en synthétisant ses protéines constitutives. Ils jouent un rôle dans la régulation de la perméabilité paracellulaire par stabilisation des jonctions étanches entre les cellules endothéliales. Ils servent enfin de première ligne de défense lors de la rupture de la BHE grâce à leur faculté de phagocytose des substances de haut poids moléculaire ⁴³.

L'observation anatomique de la microvascularisation cérébrale montre que des pieds astrocytaires forment un réseau de fines lamelles étroitement apposé à la surface extérieure de l'endothélium. Cette conformation laisse supposer que les astrocytes pourraient jouer un rôle d'induction dans le phénotype spécialisé de l'endothélium vasculaire. La nature chimique des signaux inductifs n'est pas complètement élucidée mais plusieurs molécules candidates (TGF- β (Transforming growth factor beta), GDNF (Glial cell-line derived neurotrophic factor), bFGF (Basic fibroblast growth factor), IL-6 (Interleukine 6) et hydrocortisone) ont déjà été suggérées ².

3.1.2. Perméabilité de la BHE.

L'aire de la membrane endothéliale dirigée vers la lumière des microcapillaires cérébraux a été estimée à 100 cm²/g de tissu. Ainsi, un cerveau humain d'un poids moyen de 1200 g se verrait doté d'une BHE de 12 m² ⁴³. En conditions normales, la

BHE assure au cerveau un environnement extracellulaire extrêmement contrôlé en limitant les mécanismes de transport des molécules selon 4 voies : diffusion passive (paracellulaire, transcellulaire, par canaux, symports ou antiports) ou facilitée, phénomènes actifs (transport ou antiport) ou endocytose (figure 3.3).

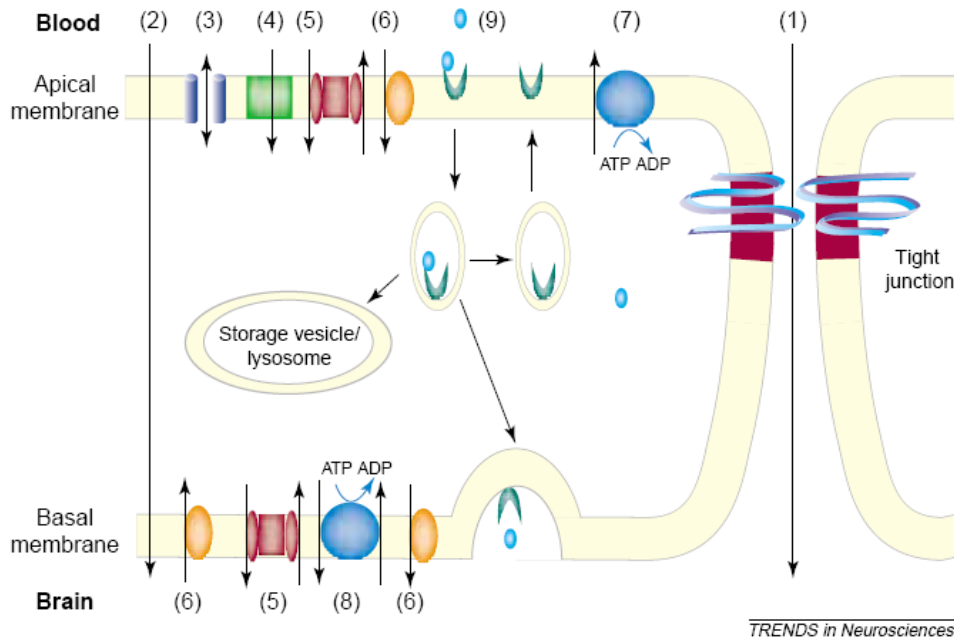


Figure 3.3 : Les différents types de transport au niveau de la BHE. (1) diffusion paracellulaire ; (2) diffusion transcellulaire ; (3) canaux cationiques ; (4) symports ioniques ; (5) antiports ioniques ; (6) diffusion facilitée ; (7) transport actif ; (8) antiport actif ; (9) endocytose (couplée à des récepteurs). D'après Huber et coll¹⁰⁰.

Les substances fortement lipophiles peuvent facilement traverser la BHE par simple diffusion. Dans ce cas, leur vitesse de pénétration dans le cerveau dépendent de leur solubilité lipidique, estimées par leur coefficient de partage huile/eau (figure 3.4). Par exemple, la solubilité de composés très lipophiles (éthanol, nicotine, iodoantipyrine, diazepam) est tellement grande qu'ils sont extraits totalement du sang lors d'un unique passage à travers le cerveau. Dans ce cas, leur capture par le cerveau n'est limitée que par le flux sanguin ce qui fait de l'iodoantipyrine un excellent traceur pour la mesure du DSC. Les molécules polaires (glycine, catécholamines) entrent au contraire très lentement dans le cerveau, ce qui permet de l'isoler des neurotransmetteurs présents dans le plasma. Finalement, certaines molécules entrent dans le cerveau plus lentement que la vitesse prédite par leur solubilité lipidique parce qu'elles se lient à des protéines plasmatiques (phénobarbital).

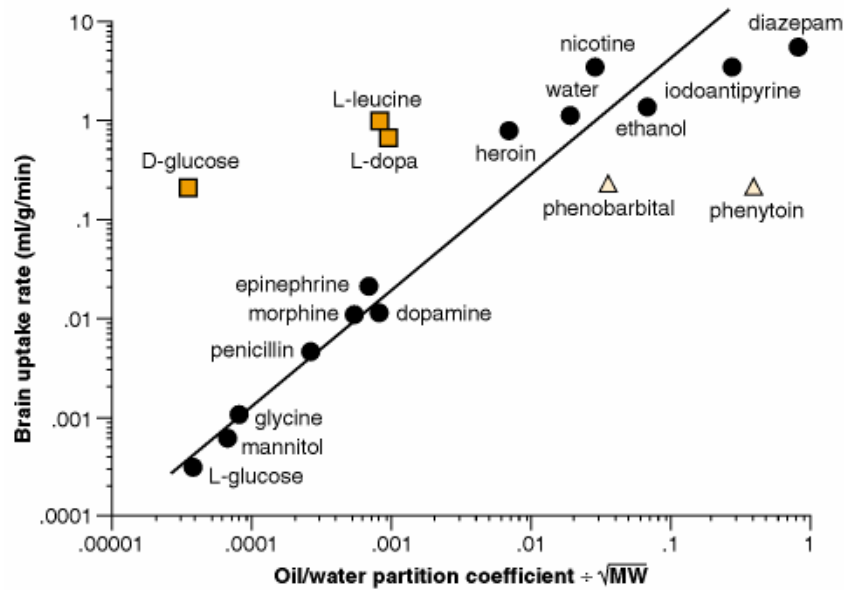


Figure 3.4 : Relation entre la solubilité lipidique et la capture cérébrale de quelques composés. Les valeurs de solubilités lipidiques sont ajustées en fonction des poids moléculaires (MW). En général, plus le coefficient de partage huile/eau est élevé, plus la vitesse de capture cérébrale est grande (●). Les vitesses de pénétration du phénobarbital et de la phénytoïne (anticonvulsivants) sont inférieures à celles prédites par leurs coefficients de partage car ils se lient à des protéines plasmatiques (▲). Pour le D-glucose, la L-dopa et la L-leucine (■), la vitesse de capture est plus grande que celle prédite par le coefficient de partage car ils traversent la BHE grâce à des transporteurs spécifiques. Issu de *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects* ¹⁹⁶.

L'eau entre également dans le cerveau par diffusion grâce à des canaux aqueux de la famille des aquaporines. Sa vitesse d'échange entre le compartiment vasculaire et le tissu cérébral est très rapide et l'eau traverse librement la BHE en suivant les variations d'osmolarité du plasma. Cette propriété est utilisée en clinique pour l'administration de composés faiblement perméables comme le mannitol, qui déshydrate le cerveau par un mécanisme osmotique et permet ainsi de réduire la pression intracrânienne.

Les gaz comme le CO₂, l'O₂, le N₂O, le Xe et les anesthésiques volatiles diffusent rapidement dans le cerveau ¹⁷. La vitesse à laquelle leurs concentrations cérébrales s'équilibrent avec les concentrations plasmatiques est limitée par le DSC. En conséquence, les gaz inertes comme le Xe et le N₂O peuvent être utilisés pour des mesures quantitatives du DSC. Les jonctions serrées étanches limitent le flux paracellulaire de molécules hydrophiles. Le cerveau a donc dû développer des systèmes de transport spécialisés pour assurer son approvisionnement en éléments nutritifs. Le D-glucose (mais pas le L-glucose) entre dans le cerveau grâce à un transporteur stéréospécifique GLUT-1, présent de façon importante dans les cellules endothéliales des capillaires. Les acides monocarboxyliques (L-lactate, acétate,

pyruvate et cétones) sont transportés séparément par des systèmes stéréospécifiques. Certains L-acides aminés neutres et de grande taille (phénylalanine, leucine, tyrosine, isoleucine, valine, tryptophane, méthionine, L-dopa) sont essentiels et ne peuvent pas être synthétisés par le cerveau. Ils doivent donc être fournis par l'alimentation et entrent dans le cerveau aussi rapidement que le glucose grâce à des transporteurs. Au contraire, des petits acides aminés neutres (alanine, glycine, proline et acide γ -aminobutyrique (GABA)) ont un passage cérébral restreint. Plusieurs d'entre eux sont des neurotransmetteurs et sont synthétisés directement par le cerveau. Les vitamines ne sont pas synthétisées par le cerveau et nécessitent des systèmes de transport spécifiques, de faible capacité en adéquation avec la faible quantité nécessaire de ces composés dans le cerveau.

La plupart des protéines du plasma ne sont pas capables de traverser la BHE en raison de leur taille importante et de leur hydrophilie. Les concentrations d'insuline et de transferrine varient au contraire dans le cerveau de façon inattendue avec les changements de concentrations plasmatiques. Un processus d'endocytose couplée à des récepteurs est responsable de ce transport¹⁰⁰. Suite à la liaison de la protéine sur son récepteur, une partie de la membrane comprenant le complexe récepteur-protéine est endocytée sous forme de vésicule puis la protéine intacte est relarguée sur l'autre face de la cellule endothéliale. Les protéines polycationiques et les leptines traversent la BHE suivant un processus d'endocytose d'absorption, c'est-à-dire que les protéines se lient aux sucres des glycoprotéines membranaires en fonction de leur charge et de leur affinité, et non pas à un récepteur.

3.1.3. Mécanismes de rupture de la BHE au cours de l'ischémie cérébrale.

La rupture de la BHE au cours de l'ischémie cérébrale est responsable d'un afflux d'eau dans le tissu cérébral et du développement d'un œdème. La physiopathologie de l'œdème cérébral est extrêmement complexe et les mécanismes qui le génèrent sont totalement intriqués (figure 3.5). L'œdème vasogénique est dépendant du degré de dysfonction de la BHE, conditionné par la durée de l'ischémie, et du degré de reperfusion⁷⁵. La reperfusion va agir à deux niveaux dont l'importance respective n'est pas élucidée. Le premier niveau est l'exacerbation des phénomènes oxydatifs et inflammatoires capables d'engendrer une détérioration structurelle de la BHE (origine biochimique).

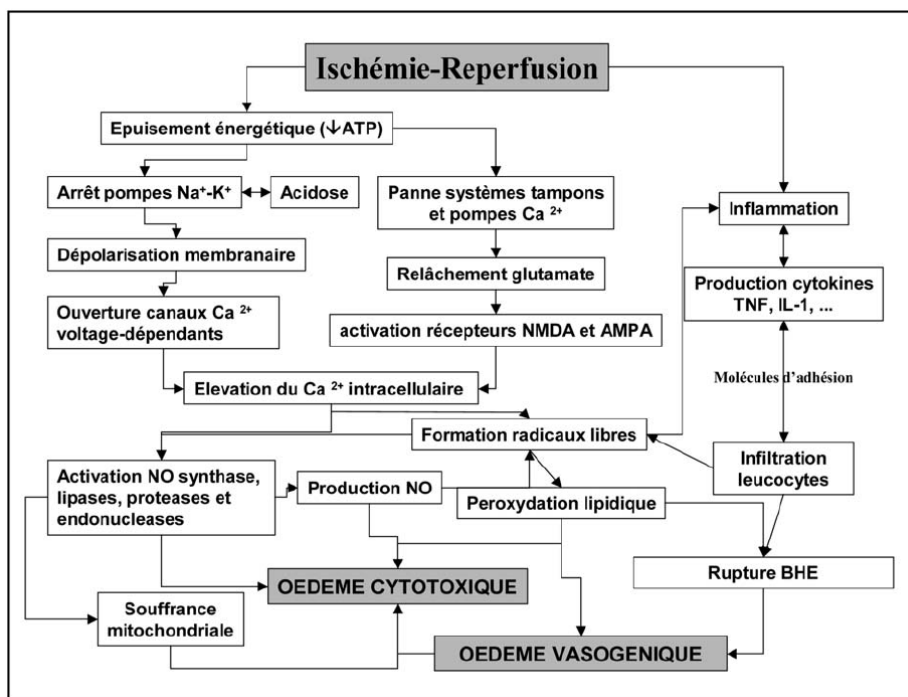


Figure 3.5 : Mécanismes physiopathologiques menant à la formation de l'œdème cytotoxique et vasogénique. D'après Gasche et coll⁷⁵.

Le second niveau est la remise sous pression du système vasculaire déjà altéré par l'ischémie. Avec le retour du DSC, la BHE va présenter une fuite capillaire fonction des pressions et du débit dans les vaisseaux (origine mécanique).

3.1.3.1. Stress oxydatif.

Lors de la reperfusion, l'oxygène apporté est le substrat de diverses réactions d'oxydation enzymatiques conduisant à la formation d'espèces oxygénées réactives. De plus, la quantité d'oxygène fournie est supérieure à celle qui peut être utilisée par les mitochondries en conditions physiologiques normales³⁶. Il en résulte une surproduction de radicaux oxygénés qui ne peuvent pas être piégés puisque les systèmes de défense antioxydants (superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxydase) ont été inactivés durant l'ischémie et que les réserves en antioxydants (glutathion, acide ascorbique, vitamine E) sont épuisées. L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ ainsi généré est capable d'initier une réaction oxydative en chaîne hautement toxique, en présence de xanthine oxydase. Les cellules endothéliales sont une source majeure d' $O_2^{\cdot-}$ en raison de leur haut niveau en xanthine oxydase. L' $O_2^{\cdot-}$ est normalement transformé en présence de SOD cytoplasmique ou mitochondriale en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), lui-même métabolisé par la catalase et la glutathion peroxydase. Dans des conditions d'ischémie-reperfusion, ce déséquilibre oxydatif est délétère pour la BHE. La génération

d'oxyde nitrique (NO) par la nitrique oxyde synthase (NOS), induite au cours de l'ischémie cérébrale par la libération de glutamate et l'entrée de calcium dans les cellules, est également capable de provoquer une rupture de la BHE¹⁴⁹.

Le développement récent de la technologie transgénique a permis de produire des souris mutantes de génotypes divers pour leurs systèmes/protéines antioxydants (tableau 3.1). Ces animaux mutants (souris SOD ou NOS knockout) ont déjà permis d'étudier et de confirmer le rôle des oxydants et antioxydants dans la pathologie ischémique.

Gène	Protéine	Transgène / Knockout	Modèle	Effet	Référence
SOD-1	CuZn-SOD	Transgène humain	Ischémie cérébrale permanente Occlusion permanente de l'ACM droite + ligature permanente de l'ACC droite + ligature 1h ACC gauche	+ à 24h post-occlusion	Kinouchi et coll 1991 ¹¹⁶
SOD-1	CuZn-SOD	Transgène humain	Ischémie cérébrale transitoire Occlusion de l'ACM 3h + 3h reperfusion	+ à 6h post-occlusion	Yang et coll 1994 ²³¹
SOD-1	CuZn-SOD	Transgène humain	Ischémie cérébrale permanente Occlusion de l'ACM	NP à 24h post-occlusion	Chan et coll 1993 ³⁷
nNOS	NOS neuronale	Knockout homozygote (-/-)	Ischémie cérébrale permanente Occlusion de l'ACM	+ à 24 et 72 h post-occlusion	Huang et coll 1994 ⁹⁹

Tableau 3.1: Souris knockout et mutantes pour l'étude du rôle des oxydants dans l'ischémie cérébrale. + : protection neuronale ; - : aggrave l'infarctus ischémique ; NP : pas de protection ; NOS : nitric oxide synthase ; SOD : superoxyde dismutase. AAC : artère carotide commune.

3.1.3.2. Protéolyse.

L'intégrité des microvaisseaux cérébraux implique des récepteurs pour des molécules d'adhésion qui se lient avec des composants spécifiques de la lame basale. L'intégrine $\alpha1\beta1$, un récepteur pour la laminine-1 et le collagène IV, est présente sur l'endothélium microvasculaire. L'intégrine $\alpha6\beta4$ est exprimée sur les pieds astrocytaires à proximité de la laminine-5, son ligand sur la matrice extracellulaire²³⁹. La perte de ces constituants peut en conséquence induire une ouverture de la BHE. Trois voies de dégradation des composants de la lame basale ont été identifiées : (1) l'activation du plasminogène par des activateurs endogènes, (2) l'activation de métalloprotéases (MMP) et (3) la production de granules enzymatiques leucocytaires. Deux types d'activateurs du plasminogène (l'urokinase et l'activateur du plasminogène tissulaire) ont été identifiés dans le cerveau sain des mammifères. Ces protéases à sérine catalysent la conversion du plasminogène en plasmine, une protéase capable de dégrader la plupart des protéines extracellulaires, dont la laminine¹⁸⁶.

Les MMP sont des enzymes protéolytiques secrétées sous forme de précurseurs qui jouent un rôle physiologique actif dans la réorganisation de la matrice extracellulaire (tableau 3.2).

Type d'ischémie	MMP	Substrat	Type cellulaire
Focale	MMP-2	Lame basale	Astrocytes
	MMP-9	Lame basale	Vaisseaux sanguins Neurones Cellules inflammatoires
	MMP-3	Protéoglycanes de la matrice extracellulaire	Neurones Microglie Péricytes Neurones
	TIMP-3		Neurones
Globale	MMP-9	Lame basale	Neurones pyramidaux CA Neurones Microglie Astrocytes
	TIMP-1		Méninges et épendyme Astrocytes Neurones pyramidaux CA

Tableau 3.2 : Expression des métalloprotéases (MMP) et de leurs inhibiteurs (TIMP) après une ischémie cérébrale. D'après Cunningham et coll⁴⁵.

La gélatinase A (MMP-2) et la gélatinase B (MMP-9) digèrent spécifiquement le collagène de type IV de la lame basale endothéliale. La stromelysine (MMP-3) dégrade un large spectre de protéines de la matrice extracellulaire (cartilage, protéoglycanes, fibronectine, collagènes de type IV et XI et laminine). La collagénase interstitielle (MMP-1) est la seule enzyme capable d'initier la dégradation du collagène fibrillaire de type I, II et III. L'activation des MMP est un processus complexe hautement régulé qui implique des inhibiteurs naturels (TIMP). Les mécanismes exacts d'activation des MMP après une ischémie-reperfusion ne sont pas complètement connus bien qu'un rôle possible des radicaux libres dans cette activation ait été suggéré⁶⁹. Finalement, des enzymes libérées à partir des granules leucocytaires durant leur activation (collagénase MMP-8, élastase et cathepsine G) sont également capables de dégrader la laminine et le collagène²³⁹. La digestion de la membrane basale résultante de ces différents processus relâche l'ancrage des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire et altère la fonction des jonctions serrées qui maintiennent normalement l'imperméabilité de la BHE.

3.1.3.3. Processus inflammatoires.

La réaction inflammatoire joue un rôle important dans la pathologie de l'ischémie cérébrale. Une réaction inflammatoire précoce se produit et de nombreux médiateurs

chimiques sont libérés par les cellules endothéliales¹⁶⁷ (histamine, acide arachidonique, radicaux libres, NO, bradykinine). Une amplification de la réaction inflammatoire initiale se produit ensuite par l'activation en cascade de médiateurs pro-inflammatoires par les cellules endothéliales, en particulier des cytokines (interleukine-1, facteur nécrosant tumoral α (TNF- α)). Ces activations permettent l'extravasation leucocytaire et macrophagique qui prolonge à son tour le phénomène inflammatoire¹⁸⁵. Ces processus inflammatoires fragilisent la BHE et augmentent ainsi le risque d'œdème vasogénique.

3.1.3.4. Augmentation de la pression hydrostatique.

Il est connu depuis longtemps qu'une augmentation de la pression hydrostatique induit l'apparition d'un œdème vasogénique dans la zone de pénombre au cours d'une ischémie cérébrale¹⁶⁷. L'arrêt ou la réduction de la perfusion cérébrale sensibilise l'endothélium vasculaire (phénomènes de friction des cellules endothéliales, étirement, compression externe) à l'hyperémie réactionnelle post-ischémique se produisant après la perte de l'autorégulation dans ces zones lésées.

3.1.4. Chronologie d'ouverture de la BHE.

L'ouverture de la BHE au cours de la pathologie ischémique est un processus extrêmement complexe et non complètement élucidé malgré les nombreuses études expérimentales déjà menées pour tenter d'en expliquer les mécanismes et la chronologie. La plupart d'entre elles utilisent des colorants, des radio-traceurs ou des protéines biologiques pour accéder à des mesures quantitatives de la perméabilité. D'autres utilisent l'IRM pour suivre l'extravasation d'un agent de contraste, injecté par voie systémique, dans le tissu cérébral. Il est généralement admis que la BHE demeure imperméable (au gadopentétate de méglumine, Gd-DTPA, 938 Da) jusqu'à 6 heures après une ischémie cérébrale permanente alors que l'ischémie transitoire provoque une ouverture bi-phasique de la BHE (à la peroxydase de raifort, HRP, 44000 Da), immédiatement après la reperfusion et plus tardivement après plusieurs heures^{109, 173}. Cette augmentation de perméabilité est souvent attribuée à l'hyperémie réactive survenant au cours d'une reperfusion soudaine comme c'est le cas dans le modèle d'occlusion intraluminale. En effet, une étude sur un modèle d'ischémie cérébrale induite par l'endothéline-1 engendrant une reperfusion lente et graduelle ne montre pas d'ouverture de la BHE à l'acide ¹⁴C-aminoisobutyrique (¹⁴C-AIB, 103 Da) associée à la reperfusion⁷⁴. Cependant, Harris et coll⁸⁸ ont montré une ouverture immédiate de la BHE au gadotérate de méglumine (Gd-DOTA, 590 Da) dans un modèle d'ischémie cérébrale induite par des microsphères d'amidon injectées dans l'artère carotide

interne. Ce modèle n'entraîne pas non plus d'hyperémie puisque la dégradation enzymatique de l'amidon conduit, comme dans le cas de l'endothéline-1, à une reperfusion graduelle. Les différences de résultats entre ces études soulignent le problème de la validité des comparaisons entre des mesures de perméabilité utilisant différents traceurs et différents modèles animaux. Ces comparaisons doivent être interprétées avec prudence en fonction des différences propres aux traceurs (poids moléculaire, charge et affinité pour les constituants sanguins) et des différences dans les méthodes utilisées pour modéliser et acquérir les données (type d'anesthésie, contrôle de la température, présence ou absence de reperfusion, durée de l'occlusion et de la reperfusion). Plusieurs études décrites ci-après confirment l'importance de ces différents paramètres.

Concernant les caractéristiques du traceur utilisé, Harris et coll⁸⁸ ont montré que la perméabilité d'un soluté est hautement dépendante de son poids moléculaire. Dans leur modèle d'ischémie cérébrale transitoire induite par microsphères d'amidon, la BHE est perméable au Gd-DTPA alors qu'elle ne l'est pas à l'HRP au même instant. Dans une étude d'ouverture de la BHE par choc hyperosmotique, Mayhan et coll¹⁵⁰ ont montré un transport taille-dépendant de molécules de dextran couplées à la fluorescéine, suggérant un mécanisme d'ouverture par formation de pores dans la membrane.

Quand on s'intéresse à la charge des molécules, on peut citer les travaux de Fenard et coll⁶⁶ montrant l'influence de la charge et de l'enrobage lipidique sur la perméabilité de nanoparticules dans un modèle de BHE *in vitro*. Ainsi, des particules ioniques et recouvertes de lipides traversent 3 à 4 fois plus la BHE que des particules ioniques non recouvertes. L'enrobage lipidique de particules neutres ne modifie pas leur perméabilité.

La liaison des traceurs étudiés aux protéines sériques peut largement influencer leur passage à travers la BHE. Le bleu Evans, colorant largement utilisé dans les études de perméabilité, a un poids moléculaire de 960 Da. Injecté dans la circulation sanguine, il se lie fermement à l'albumine plasmatique (66 000 Da) pour former un complexe beaucoup plus gros dont il faudra tenir compte dans l'interprétation des données¹⁶⁸.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, les modèles animaux d'ischémie cérébrale sont nombreux et variés et peuvent influencer le profil d'ouverture de la BHE et l'apparition de l'œdème vasogénique. Il est connu que le modèle d'occlusion intraluminale induit une reperfusion brutale au retrait du filament, contrairement aux modèles à l'endothéline et aux microsphères d'amidon comme cités précédemment. Le modèle avec craniectomie modifie la pression intracrânienne directement liée à l'œdème vasogénique. La craniectomie est d'ailleurs un traitement chirurgical des complications de l'ischémie cérébrale en clinique qui minore l'œdème vasogénique et l'augmentation de la pression intracrânienne associée⁶¹.

Le rôle neuroprotecteur d'une hypothermie post-ischémique a largement été démontré dans de nombreuses études sur l'animal¹⁸⁸. Le bénéfice de ce traitement proviendrait

d'une atténuation de plusieurs processus délétères impliqués dans la mort cellulaire par nécrose et apoptose. Des études cliniques ont déjà débuté pour tester l'efficacité de ce traitement chez l'homme ⁴⁷.

De même, les agents anesthésiques et par conséquent le pH, les gaz du sang et la pression artérielle, influencent la physiopathologie de l'ischémie cérébrale expérimentale ²³³. Ces paramètres physiologiques intra et post-ischémiques déterminent la mortalité et l'issue histologique après une ischémie cérébrale focale. Les mécanismes exacts de neuroprotection sont encore mal connus mais certains anesthésiques pourraient agir par diminution de la demande métabolique en oxygène ou par augmentation du DSC. Pour plus de détails, se reporter au chapitre 4 qui sera consacré à l'influence des agents anesthésiques sur le développement de l'ischémie cérébrale.

Dans une étude comparant l'ischémie cérébrale transitoire et permanente, Kastrup et coll ¹⁰⁹ ont montré en IRM que l'ouverture de la BHE dépendait de la durée d'occlusion et de la durée de reperfusion. Après reperfusion, l'ouverture de la BHE est plus massive qu'au même instant dans une occlusion permanente. De même, une reperfusion tardive cause plus de dommages qu'une reperfusion effectuée tôt, ce qui montre une réelle influence de la durée d'occlusion sur l'issue de l'ischémie cérébrale ¹⁵⁷. Ce facteur « temps » est particulièrement important en clinique où il définit la fenêtre thérapeutique d'administration du rt-PA, fixée à 3 heures après le début des symptômes pour minimiser les dommages induits par la reperfusion.

Le tableau 3.3 résume différentes études menées chez l'animal sur l'ouverture de la BHE dans l'ischémie cérébrale et spécifie certains paramètres (modèle d'ischémie, durée d'occlusion et de reperfusion, traceur utilisé) pouvant influencer les résultats obtenus. Il nous servira de base de comparaison dans l'interprétation de nos propres résultats. Il est cependant impossible de prendre en compte tous les paramètres dont nous venons de discuter précédemment car les études sont très hétérogènes entre elles et s'attachent plus ou moins à vérifier et contrôler ces paramètres.

Références	Modèle d'ischémie	Durées d'occlusion	Durées de reperfusion étudiées	Technique - traceur (poids moléculaire)	Rupture de la BHE
Petito et coll, 1979 ¹⁶⁸	Focale transitoire rat Occlusion d'une artère carotide commune et hypoxie	28min	1min, 30min 1h30min, 2h	Microscopie HRP (44 000 Da) Bleu Evans (961 Da)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Immédiate à HRP et jusqu'à 2h ▪ Retardée au Bleu Evans à partir de 1h30min
Pluta et coll, 1994 ¹⁷³	Globale transitoire rat Arrêt cardiaque	3,5min, 5min, 10min	2, 3, 5 et 15min 1, 3 et 6 h 24h	Microscopie HRP (44 000 Da)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ouverture bi-phasique ▪ Dès 2min jusqu'à 1h ▪ Puis après 6h et jusqu'à 24h Quelle que soient les durées d'occlusion et reperfusion
Lo et coll, 1994 ¹³²	Focale transitoire lapin Occlusion transorbitale – clips sur les artères carotides interne, antérieure et ACM	4h	6h	IRM T₁W Gd-DTPA (938 Da) Microscopie IgG plasmatiques (200 000 Da)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ouverture aux deux traceurs mais de façon plus importante aux IgG
Gartshore et coll, 1997 ⁷⁴	Focale transitoire rat Endothéline-1 sur l'ACM	Variable, comprise entre 30 et 60min	Graduelle, suivie à 1, 2 et 4h	Radio-traceur ¹⁴ C-AIB (103 Da) Microscopie Bleu Evans (961 Da)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aucune ouverture
Albayrak et coll, 1997 ⁶	Focale transitoire rat Occlusion intraluminale de l'ACM	1 et 2h	6, 12 et 24h	Microscopie ALB (66 458 Da) Radio-traceur ¹⁴ C-AIB (103 Da) pour le groupe 1h d'occlusion et 6h de reperfusion	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ouverture à l'ALB à 12h jusqu'à 24h (groupe 1 h d'occlusion) ▪ Ouverture à l'ALB à 6h jusqu'à 24h (groupe 2 h d'occlusion) ▪ Pas d'ouverture au ¹⁴C-AIB (groupe 1h d'occlusion)

Tableau 3.3 (1/2) : Données bibliographiques sur l'ouverture de la BHE au cours de l'ischémie cérébrale. HRP : peroxydase de raifort ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; T₁W : imagerie pondérée T₁ ; Gd-DTPA : gadopentétate de méglumine ; ALB : albumine ; AIB : acide aminoisobutyrique ; IgG : immunoglobuline G ; ACM : artère cérébrale moyenne.

Références	Modèle d'ischémie	Durées d'occlusion	Durées de reperfusion étudiées	Technique - traceur (poids moléculaire)	Rupture de la BHE
Kastrup et coll, 1999 ¹⁰⁹	<ul style="list-style-type: none"> Focale transitoire rat Occlusion intraluminale de l'ACM Focale permanente rat Occlusion intraluminale de l'ACM 	1h 3h 6h	5h 3h Aucune	IRM T₁W Gd-DTPA (938 Da) IRM T₁W Gd-DTPA (938 Da)	<ul style="list-style-type: none"> Faible ouverture pour le groupe 1h d'occlusion (2 rats / 6) Ouverture importante pour le groupe 3h d'occlusion (5 rats /5) Ouverture entre 3,5h (1 rat/6) et 6h (3 rats/6) d'occlusion
Neumann-Haefelin et coll, 2000 ¹⁵⁷	Focale transitoire rat Occlusion intraluminale de l'ACM	30min, 1h et 2h30min	30min, 1h30min et 2h30min	IRM T₁W Gd-DTPA (938 Da)	<ul style="list-style-type: none"> Aucune ouverture pour 30min d'occlusion Ouverture dès 1h30min de reperfusion pour 1h d'occlusion Ouverture dès 30min de reperfusion pour 2h30min d'occlusion
Preston et coll, 2002 ¹⁷⁴	<ul style="list-style-type: none"> Globale transitoire rat Occlusion des 2 carotides communes + hypotension Focale transitoire rat Occlusion de l'ACM par microclip après craniotomie 	16 à 20min 2h	24h 24, 48 et 72h	Radio-traceurs ¹⁴ C-sucrose (342 Da) ³ H-inuline (5 000 Da) Radio-traceurs ¹⁴ C-sucrose (342 Da) ³ H-inuline (5 000 Da)	<ul style="list-style-type: none"> Ouverture au sucrose et à l'inuline (sucrose > inuline) Idem avec un pic à 48h
Harris et coll., 2002 ⁸⁸	Focale transitoire rat Microsphères d'amidon	60min environ	Graduelle	IRM T₁W Gd-DTPA (938 Da) Microscopie HRP (44 000 Da)	<ul style="list-style-type: none"> Immédiate à Gd-DTPA (70min après l'occlusion) Inexistante à HRP

Tableau 3.3 (2/2) : Données bibliographiques sur l'ouverture de la BHE au cours de l'ischémie cérébrale. HRP : peroxydase de raifort ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; T₁W : imagerie pondérée T₁ ; Gd-DTPA : gadopentétate de méglumine ; ALB : albumine ; AIB : acide aminoisobutyrique ; IgG : immunoglobuline G ; ACM : artère cérébrale moyenne.

Chez l'homme, les manifestations cliniques d'un œdème cérébral deviennent généralement évidentes entre 2 et 5 jours après le début des symptômes. L'œdème cérébral est une cause majeure de détérioration clinique dans les 24 premières heures et les décès survenant dans les premiers jours sont souvent dus à un engagement cérébral¹³. L'intégrité de la BHE peut être suivie de façon non-invasive par IRM après injection de Gd-DTPA (acide gadolinium-diéthylène triamine penta-acétique) qui ne traverse pas la BHE intacte. Dans une étude regroupant 144 patients souffrant d'ischémie cérébrale focale, Latour et coll¹²⁵ ont observé des signes évidents d'ouverture de la BHE chez 47 patients (33%) dans les 24 premières heures après le début des symptômes (moyenne à 12,9 heures). L'ouverture de la BHE était plus répandue chez les patients ayant subi une thrombolyse par rt-PA (45%) que chez les patients sans traitement (18%). Une transformation hémorragique a été observée chez 22 patients dont 16 (73%) montraient déjà une ouverture de BHE. Seules quelques études ont été réalisées chez l'homme pour comparer le degré d'ouverture de la BHE et les dommages neurologiques après l'ischémie cérébrale. Lorberboym et coll¹³⁴ ont évalué quantitativement par scintigraphie du ^{99m}Tc-DTPA (SPECT), l'ouverture de la BHE chez 30 patients souffrant d'une occlusion de l'ACM et traités à l'admission avec 325 mg d'aspirine. Vingt-trois patients (77%) montraient une ouverture de la BHE entre 48 et 72 heures après le début des symptômes. Cette ouverture de barrière était en outre significativement corrélée à une mauvaise issue neurologique des malades.

3.2. Présentation et objectifs de l'étude.

Les patients souffrant d'ischémie cérébrale et traités par rt-PA dans les 3 heures après le début de l'attaque montrent une réelle amélioration de leur état clinique évalué 3, 6 et 12 mois plus tard^{124, 210}. Cependant, plusieurs complications généralement associées à une rupture de la BHE empêchent l'utilisation en routine de ce traitement en clinique. Chez ces patients traités, la rupture de BHE est reconnue comme un facteur contribuant à la survenue d'un œdème cérébral sévère¹³ et d'une transformation hémorragique de mauvais pronostic²³⁹. L'ouverture de BHE conduirait dans ces cas à une extravasation du rt-PA dans l'espace extravasculaire et à une augmentation de la mortalité par aggravation des mécanismes excitotoxiques¹⁷⁰. La thérapie thrombolytique procure donc un bénéfice au patient mais est également associée à un risque non négligeable lié à la recanalisation et à l'ouverture de la BHE. D'un autre point de vue, il pourrait être judicieux d'utiliser cette ouverture afin de permettre l'apport de médicaments au sein du tissu cérébral pour réduire les complications de la thrombolyse et de l'ischémie^{21, 220}. Dans ce contexte, il est primordial de mieux connaître la chronologie d'ouverture de la BHE après reperfusion afin d'améliorer le traitement et le pronostic de l'ischémie. La phase de reperfusion immédiate suivant l'occlusion a été

très peu étudiée malgré son importance en clinique puisqu'elle correspond à la fenêtre thérapeutique d'administration du rt-PA. Nous avons choisi d'utiliser l'IRM pour caractériser l'ouverture de la BHE après une ischémie cérébrale focale transitoire chez le rat. L'IRM a déjà largement démontré ses capacités à suivre de façon non invasive l'évolution des dommages ischémiques chez l'animal et en routine clinique par imagerie de diffusion et de perfusion ¹⁸¹.

La plupart des études menées chez l'animal ont utilisé l'imagerie pondérée T_1 (T_1W) pour suivre le changement de signal induit par l'extravasation d'un agent de contraste unique dans le tissu cérébral ^{109, 132, 157}. Nous nous proposons de caractériser plus spécifiquement l'ouverture de la BHE en utilisant deux agents de contraste de poids moléculaires différents, le Gd-DOTA (590 Da) et l'ion manganèse (Mn^{2+} , 55 Da), au cours d'un protocole basé sur des mesures quantitatives de T_1 . Ces deux agents sont paramagnétiques et induisent une réduction du T_1 tissulaire lorsqu'ils traversent la BHE. L'avantage de notre étude est de suivre l'extravasation des deux agents chez le même animal pour s'affranchir des inhomogénéités spatiales induites par le modèle d'occlusion intraluminale. Nous avons étudié de cette manière la première heure de reperfusion après une occlusion de 30 min, 1h30 min et 2h30 min.

3.3. Matériels et méthodes.

3.3.1. Modèle animal et protocole.

Le protocole de cette étude a été approuvé par le comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale Rhône-Alpes sous le numéro 014. Les expérimentations ont été menées sous les autorisations n° 380321 pour le chercheur impliqué, A3851610004 pour les locaux d'expérimentation et B3851610003 pour les locaux d'animalerie.

Vingt-sept rats mâles (317 ± 16 g) de souche Sprague-Dawley (Janvier, Le Genest St Isle, France) ont été divisés en 3 groupes selon la durée d'occlusion : 30 min (groupe A, n=8), 1h30 min (groupe B, n=9) et 2h30 min (groupe C, n=10).

L'anesthésie a été induite par inhalation d'isoflurane 5% (TEM, Lormont, France) dans un mélange air : oxygène contenant 30% d' O_2 puis maintenue tout au long du protocole grâce à une infusion intrapéritonéale d'hydrate de chloral (4%, 1,5 ml/h, Fluka, France). Les rats ont été trachéotomisés et ventilés artificiellement grâce à un ventilateur contrôlé en volume (CWE Inc, Ardmore, USA) à une fréquence d'environ 60 cycles/min. La température corporelle de l'animal a été mesurée et maintenue à $37,0 \pm 0,5$ °C à l'aide d'une couverture chauffante connectée à une sonde rectale (Panlab LSI Leticia, Bioseb, France). La veine fémorale gauche a été canulée pour l'injection de $MnCl_2$. L'artère fémorale droite a été canulée pour permettre l'enregistrement continu de la

PAM, l'injection du Gd-DOTA et le prélèvement de gaz du sang (analyseur ABL510, Radiometer, Copenhagen, 0,1 ml par échantillon, 2 prélèvements pour le groupe A à 20 min et 1h20 min post-occlusion (post-MCAO), 3 prélèvements pour le groupe B à 20 min, 1h20 min et 2h20 min post-MCAO, 4 échantillons pour le groupe C à 20 min, 1h20 min, 2h20 min et 3h20 min post-MCAO). L'ischémie cérébrale focale a été induite par occlusion intraluminale de l'ACM selon le protocole déjà décrit au chapitre 2.

3.3.2. Protocole d'IRM.

Les données d'IRM ont été acquises dans un aimant horizontal de 7T (diamètre 20 cm, Magnex scientific Inc., Yarnton, Royaume uni) équipé d'une bobine de gradients à 200 mT/m et piloté par une console SMIS (Surrey Medical Imaging Systems, Royaume Uni). Une antenne de volume quadrature (diamètre interne 79 mm, Rapid Biomedical GmbH, Allemagne) a été utilisée pour l'émission/réception. Les animaux ont été positionnés dans un berceau et maintenus par des barres d'oreille et une barre à dents pour minimiser les mouvements de la tête. Une coupe coronale a été positionnée sur une image sagittale de repérage à la position approximative de $-0,5 \pm 0,5$ mm par rapport au bregma.

Plusieurs types de données, dont les paramètres des séquences correspondantes sont détaillés dans le tableau 3.4, ont été acquis :

1. Des images angiographiques en écho de gradient 3 dimensions pour vérifier l'occlusion et la reperfusion.
2. Des images spin écho pondérées en T_1 pour visualiser l'extravasation des agents de contraste.

Image / séquence	ARM	T_1W	Carte T_1	DW
TR	70	600	5,7	2000
TE	9	18	3,2	8
Champ de vue (mm)	36x36x8	40x40	40x40	40x40
Taille de la matrice	196x192x32	256x256	64x64	128x66
Epaisseur de coupe (mm)	0,25	1	2,00	2,00
Temps d'inversion TI (ms)	/	/	8 TI entre 20 et 5830	/
Délai de récupération (après l'image et avant le prochain pulse 180°) (s)	/	/	5	/
Gradient de diffusion b (s/mm^2)	/	/	/	550

Tableau 3.4 : Paramètres des séquences IRM utilisées.

3. Des cartes de T_1 pour quantifier l'extravasation des agents de contraste réalisées avant la reperfusion et pendant l'injection des agents de contraste en utilisant une séquence FLASH d'inversion-récupération⁷⁹. L'inversion a été obtenue avec une impulsion radiofréquence (RF) adiabatique non sélective pour supprimer la contribution des effets de flux au signal²⁰.
4. Des images pondérées en diffusion (DWI) pour visualiser l'étendue de l'œdème ischémique avant reperfusion. Quatre images acquises (3 en présence du gradient de diffusion dans chacune des 3 directions orthogonales respectivement, 1 en absence du gradient de diffusion).

Le protocole expérimental pour un animal recevant des agents de contraste est détaillé dans la figure 3.6.

Pour le groupe A, seule la carte de T_1 a pu être acquise avant la reperfusion, par contrainte de temps. Pour les 3 groupes, la reperfusion ($t=0$) a été vérifiée par un angiogramme d'une durée de 7 min. Pour 17 animaux ($n=4$ dans le groupe A, $n=6$ dans le groupe B et $n=7$ dans le groupe C), des cartes de T_1 ont été acquises pendant 6 min avant le début de l'injection du $MnCl_2$ (100 mM, 1,2 ml/h, Fluka, France) qui a duré jusqu'à la fin de l'expérience. L'acquisition s'est poursuivie encore pendant 15 min puis une série d'images T_1W a été réalisée. Des cartes de T_1 ont été de nouveau acquises pendant 15 min tandis qu'un bolus de Gd-DOTA (Dotarem, 0,2 mmol/kg, Guerbet, France) a été injecté par voie intra-artérielle 1 min après le début de l'acquisition.

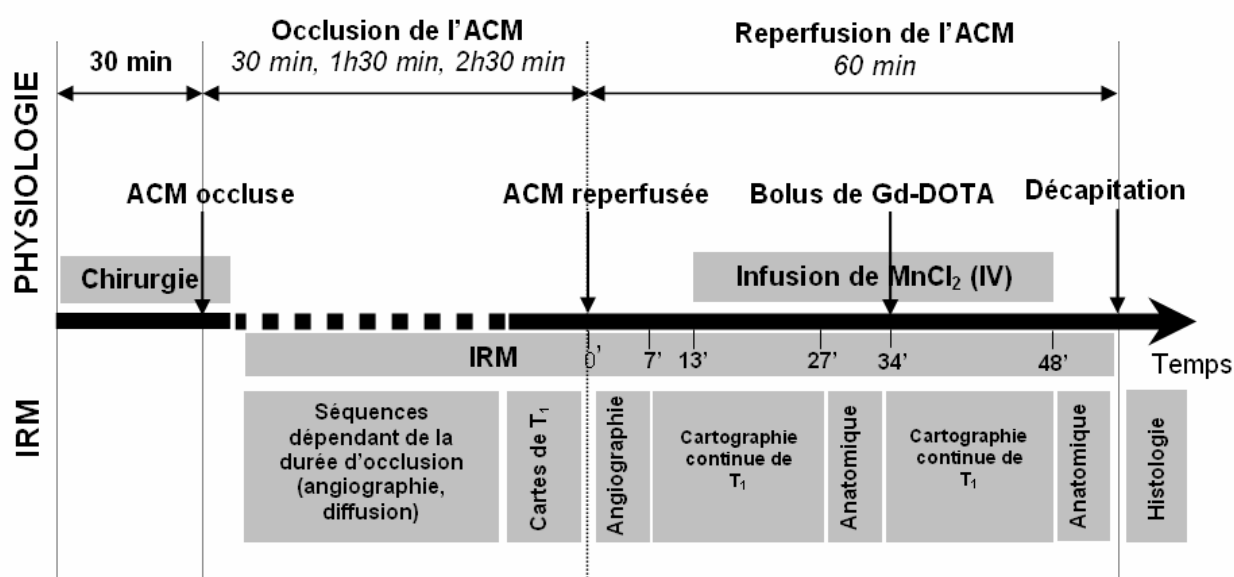


Figure 3.6 : Protocole expérimental montrant le statut de l'animal et le type de données IRM acquises en fonction du temps (schématique, pas à l'échelle).

Finalement, une série d'images T_1W a été acquise avant l'euthanasie de l'animal. Pour les 10 autres animaux ($n=4$ dans le groupe A, $n=3$ dans le groupe B et $n=3$ dans le groupe C), le protocole d'acquisition était le même mais aucun agent de contraste n'a été injecté pour constituer des groupes contrôles.

3.3.3. Histologie.

A la fin de l'expérimentation, les animaux ont été euthanasiés par une injection intra-artérielle de 1 ml de KCl 2 mol.l⁻¹. Les cerveaux des rats ayant reçu des agents de contraste ont été prélevés et rapidement congelés dans l'isopentane à -40 °C pendant 1 min puis conservés à -80 °C.

Sur chaque cerveau, deux séries de onze coupes coronales de 10 μm d'épaisseur ont été prélevées de manière à couvrir l'épaisseur de la coupe d'intérêt IRM choisie pour l'obtention des images T_1W . Les 1^{ère} coupe de la 1^{ère} série est adjacente à la 1^{ère} coupe de la 2^{ème} série et idem pour les 10 coupes suivantes. A l'intérieur d'une série, les coupes sont distantes entre elles de 200 μm . Les coupes ont été positionnées par rapport à des repères anatomiques observés sur l'image T_1W et reportés sur un atlas de cerveau de rat ¹⁶⁶. Une série de coupes a été colorée à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) puis observées en microscopie à fond clair. L'autre série de coupes a subi un double marquage immunohistologique en fluorescence avec un anticorps dirigé contre le collagène IV (N° 1340-01, Southern Biotechnology Associates Inc, Birmingham, USA) et un anticorps dirigé contre un antigène de la BHE (N° BA1116, Sternberger Monoclonals Inc, Lutherville, USA). Cet antigène de la BHE est constitué d'un triplet protéique de poids moléculaires 30, 25 et 23,5 kDa, localisé dans la membrane luminale endothéliale des microvaisseaux cérébraux. La fonction de cette protéine est inconnue. Afin d'effectuer un comptage des vaisseaux marqués par l'anticorps anti-collagène IV et des vaisseaux marqués par l'anticorps anti-protéines de BHE dans les zones cérébrales où les dommages cérébraux ont observés en HE et en imagerie T_1W , une grille (taille des carrés = 0,9 x 0,9 mm) a été placée sur chaque coupe HE de façon tangente aux bords haut et gauche de la coupe de cerveau (figure 3.7).

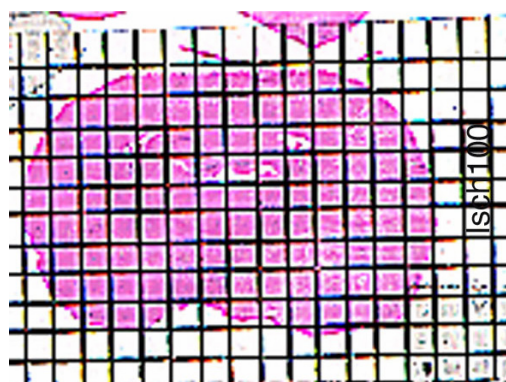


Figure 3.7 : Positionnement de la grille sur une coupe de cerveau colorée à l'HE.

Les coordonnées du centre d'un champ microscopique montrant les dommages cellulaires et de son homologue controlatéral ont été déterminées grâce à la platine motorisée du microscope et enregistrées. La grille a ensuite été transférée de la même manière sur la coupe immunohistologique, prélevée de manière adjacente à la coupe HE. Les coordonnées de la platine motorisée enregistrées précédemment ont permis de positionner le centre du champ du microscope aux mêmes endroits que sur la coupe HE. Une image du marquage collagène IV et une image du marquage BHE ont ainsi été réalisées. Un comptage du nombre de vaisseaux et de l'aire représentée par l'ensemble de ces vaisseaux a été réalisé pour chaque image grâce à un logiciel spécialement développé au laboratoire pour cette application. Succinctement, un seuillage manuel de l'image est réalisé et son résultat vérifié par rapport à l'image d'origine. Une région d'intérêt (en l'occurrence la totalité de l'image) est sélectionnée puis un masque est créé pour cette région. Le nombre d'objets ainsi que la surface de chaque objet présents dans ce masque sont comptés et répertoriés dans un classeur Excel.

3.3.4. Traitement et analyse des données.

3.3.4.1. Analyse des données IRM.

L'analyse des images IRM a été effectuée grâce à une application dédiée développée sous le logiciel MATLAB[®] (The MathWorks Inc, USA).

Les cartes de T_1 ont été générées en ajustant les données pixel par pixel à l'équation suivante :

$$M(TI) = M_0 [1 - 2c \exp(-TI/T_1)]$$

Où M_0 , c et T_1 sont les paramètres ajustés. M est l'aimantation longitudinale (M_0 est l'aimantation initiale), TI est le temps d'inversion et c est une constante caractérisant la qualité de l'inversion réalisée.

Afin de caractériser plus spécifiquement l'ouverture de la BHE aux deux agents de contraste, la concentration en Mn^{2+} avant l'injection de Gd-DOTA et la concentration en Gd-DOTA à la fin de l'expérience ont été estimées à partir des vitesses de relaxation $R_1=1/T_1$ mesurées et selon les équations suivantes :

$$R_1 \text{ (avant Gd-DOTA)} = R_{1(0)} + r_{1 \text{ Mn}} \cdot [Mn^{2+}] \text{ avant Gd-DOTA}$$

et

$$R_1 \text{ (fin expérience)} = R_{1(0)} + r_{1 \text{ Mn}} \cdot [Mn^{2+}] \text{ fin expérience} + r_{1 \text{ Gd}} \cdot [Gd-DOTA] \text{ fin expérience}$$

Où $r_{1 \text{ Mn}}$ et $r_{1 \text{ Gd}}$ sont les relaxivités respectives du manganèse et du Gd-DOTA.

$r_{1 \text{ Mn}} = 7,5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ à $7T$ ¹⁹⁷ et $r_{1 \text{ Gd}} = 2,6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ à $7T$ ³⁸. Comme ces relaxivités ont été déterminées dans du sérum physiologique et non dans le tissu, les concentrations estimées en agent de contraste seront qualifiées d' « apparentes ».

$R_{1(0)}$ est la vitesse de relaxation longitudinale en absence d'agent de contraste.

Les cartes d'ADC ont été générées en utilisant l'équation décrite par Stejskal et Tanner²⁰⁴ et en moyennant les valeurs d'ADC obtenues dans les trois directions.

Les valeurs de T_1 et d'ADC ont été mesurées dans deux régions du cerveau : une région d'intérêt (ROI) ipsilatérale dans la zone ischémique et son homologue dans l'hémisphère controlatéral. Dans les groupes avec agents de contraste, la ROI ipsilatérale a été définie manuellement d'après les images T_1W après agents de contraste et d'après les images HE. La ROI ainsi choisie, localisée dans le cortex et/ou le striatum, présente un T_1 réduit et des signes de lésions en histologie. La zone endommagée montre des neurones en souffrance et une perte d'affinité pour l'hématoxyline. Dans les groupes contrôles, les ROI sont dessinées manuellement dans les zones lésées observées sur les images de diffusion pour les groupes B et C et dans le striatum latéral pour le groupe A.

3.3.4.2. Analyses statistiques.

Les données sont toutes exprimées par leur moyenne \pm écart-type (ET). Des tests de Student non appariés ont été utilisés pour comparer les valeurs physiologiques. La significativité statistique des différences entre les valeurs ipsilatérales et controlatérales obtenues chez le même animal à différents temps a été évaluée par un test de Student apparié. La significativité statistique des différences entre les différents groupes a été

calculée par un test de Student non apparié. Dans tous les cas, le degré de significativité a été choisi à $P \leq 0,05$.

3.3.5. Mesure du contenu en eau tissulaire cérébrale au cours de l'ischémie cérébrale par gravimétrie.

Cette étude a été effectuée sur une autre série d'animaux que ceux utilisés pour l'étude de la perméabilité de la BHE. Elle a donné lieu à la publication d'un article scientifique dans NMR in Biomedicine en 2005¹⁹ présenté en annexe.

Brièvement, 6 rats mâles Sprague-Dawley ont subi le même protocole opératoire que celui décrit au paragraphe 3.3.1 (groupe ischémique). Quatre autres ont subi la chirurgie sans que l'ACM soit occluse (rats sham) et ont servi de contrôle. Au bout de 2h15 min d'occlusion de l'ACM, les animaux ont été sacrifiés par injection intracardiaque de KCl. Leurs cerveaux ont été rapidement prélevés et placés dans une boîte de Pétri sèche et maintenue au froid sur de la glace. Après quelques minutes, le tissu cérébral raffermi a été soumis à une analyse gravimétrique selon le protocole décrit par Marmarou et coll¹⁴⁴. La gravité spécifique (SG) du tissu a été déterminée dans une colonne contenant un mélange de kérosène-bromobenzène en gradient linéaire. Avant chaque analyse d'un cerveau, la colonne a été calibrée en utilisant des gouttes de solution de sulfate de potassium de SG connues (1,045, 1,040, 1,030 et 1,025). Sept échantillons tissulaires de 1 mm x 1 mm ont été prélevés dans chacune de quatre régions du cerveau (cortex gauche, cortex droit, striatum gauche et striatum droit) correspondant à un total de 28 échantillons pour chaque cerveau. Ces échantillons ont été prélevés sur une tranche de cerveau de rat de 2 mm d'épaisseur centrée sur le bregma. Pour chaque région, la moyenne de la SG a été déterminée. La calibration de la relation entre la SG du tissu et le contenu en eau du tissu a été réalisée sur 6 autres animaux ayant subi le même protocole que les animaux contrôle. La SG de chaque échantillon a été mesurée puis le contenu en eau de chaque échantillon a été déterminée par le rapport poids sec (obtenu après dessiccation de l'échantillon 24 h à 100 °C) / poids humide.

Le contenu en eau du tissu cérébral a été déterminé d'après la relation décrite par Marmarou et coll¹⁴⁴ :

$$[H_2O] (\%) = (m/SG) + b$$

Où $[H_2O]$ est le contenu en eau et m et b dépendent de la SG du tissu sec.

m et b ont été déterminés en ajustant l'équation précédente aux valeurs de $[H_2O]$ et de SG obtenues pour les 6 rats de calibration.

3.4. Résultats.

3.4.1. Paramètres physiologiques.

Le tableau 3.5 présente les paramètres physiologiques des animaux classés par groupe.

	Groupe A 30 min MCAO (n=8)	Groupe B 1h30 min MCAO (n=9)	Groupe C 2h30 min MCAO (n=10)
Pression artérielle moyenne (mm Hg)	60 ± 11	63 ± 13	64 ± 11
Température corporelle °(C)	36,9 ± 0,2	36,9 ± 0,2	36,9 ± 0,2
pH artériel	7,33 ± 0,07	7,36 ± 0,07	7,34 ± 0,08
PaCO ₂ (mm Hg)	32,1 ± 6,3	33,7 ± 5,3	33,1 ± 6,2
PaO ₂ (mm Hg)	161,2 ± 41,0	152,6 ± 41,1	166,0 ± 29,1

Tableau 3.5 : Paramètres physiologiques (moyenne ± écart-type). Les valeurs de gaz du sang issues de chaque prélèvement au cours de l'expérience sont moyennées.

Ces valeurs sont restées dans des limites physiologiques acceptables au cours de l'expérimentation et ont donc été moyennées pour chaque rat. Aucune différence significative entre groupes n'a pu être mise en évidence quel que soit le paramètre considéré.

3.4.2. Observations histologiques.

Tous les cerveaux des rats ayant reçu les agents de contraste (figure 3.8) montrent des lésions ischémiques englobant le striatum latéral et le cortex du territoire de l'ACM (atteinte cortico-striatale), le striatum latéral seulement (atteinte striatale) ou une très petite zone du cortex seulement (atteinte corticale) (tableau 3.6).

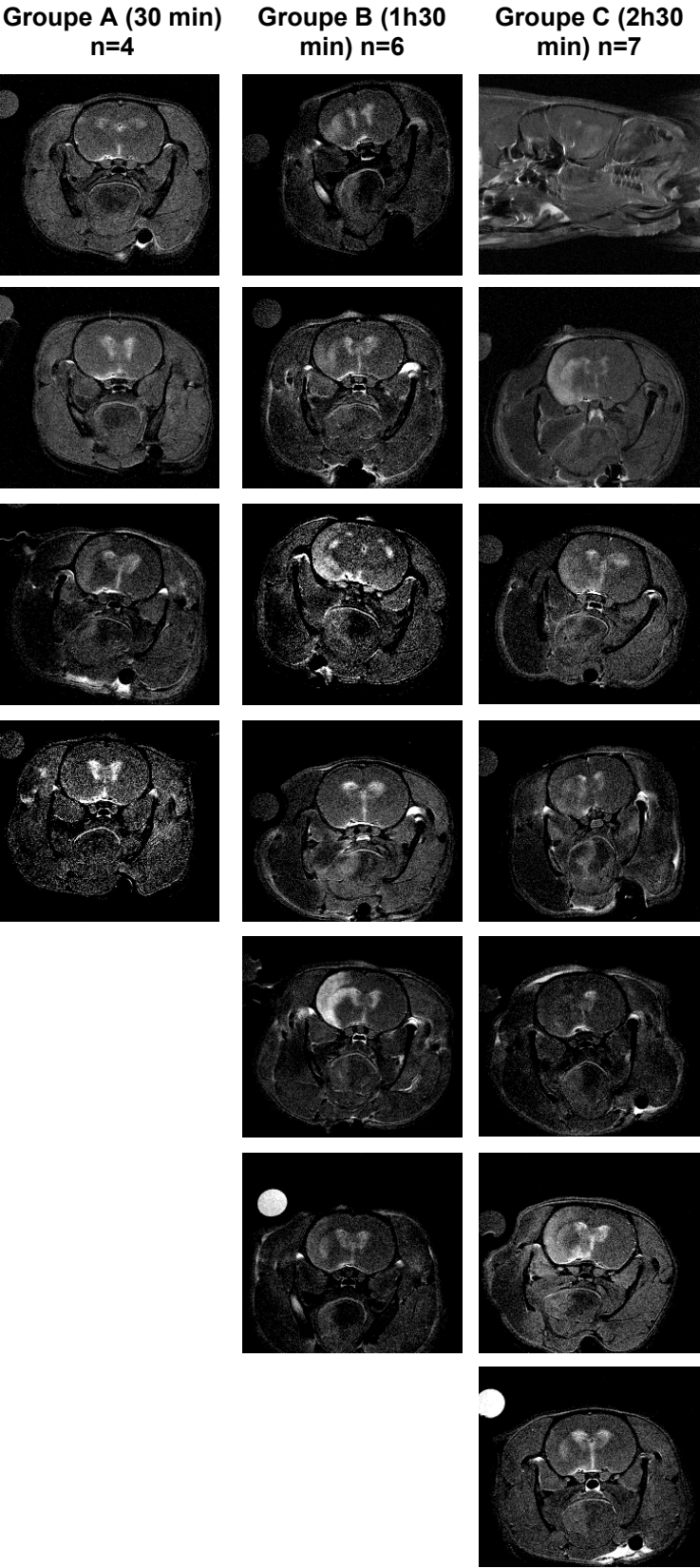


Figure 3.8 : Images T₁W obtenues pour chaque rat à la fin de l'expérience (49 min après la reperfusion) après l'injection des deux agents de contraste.

	Groupe A n=4	Groupe B n=6	Groupe C n=7
Atteinte cortico-striatale	2	5	7
Atteinte corticale localisée	2	0	0
Atteinte striatale	0	1	0

Tableau 3.6 : Répartition des types d'atteintes ischémiques par groupe.

Dans cette zone lésée, les neurones apparaissent dentelés, triangulaires, éosinophiles et montrent des noyaux plus petits et foncés. Le tissu est œdémateux et caractérisé par un cytoplasme clairsemé. L'hémisphère controlatéral montre, par comparaison, des neurones intacts pourvus de gros noyaux ronds et d'une coloration normale (figure 3.9).

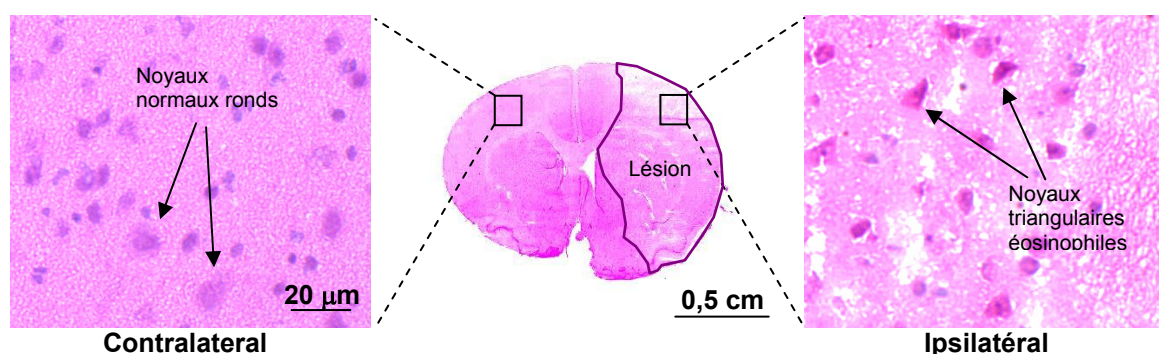


Figure 3.9 : Observation histologique des dommages tissulaires induits par l'ischémie par coloration à l'hématoxyline-éosine.

Le marquage immunocytologique du collagène IV a permis de visualiser les vaisseaux cérébraux. Celui des protéines de la BHE a permis de visualiser l'endothélium vasculaire où le triplet protéique reconnu par l'anticorps est resté intact. Cet anticorps anti-protéines de BHE a déjà été utilisé comme indicateur des dommages microvasculaires induits par l'ischémie cérébrale focale ¹³⁰.

La figure 3.10 montre des images du marquage du collagène IV et des protéines de BHE dans une zone montrant des dommages ischémiques (a et b) et dans l'hémisphère sain (c et d) chez un même rat. Le nombre de vaisseaux et la surface représentée par la totalité de ces vaisseaux sont mentionnés. Dans l'hémisphère controlatéral, le marquage du collagène IV se superpose correctement au marquage des protéines de BHE. Les vaisseaux apparaissent bien délimités et avec des contours nets sur chaque marquage. Le nombre d'objets comptés pour chacun des marquages

est presque identique (159 vs 157 objets). Dans la zone ischémisée, le marquage du collagène IV présente les mêmes caractéristiques qualitatives que dans la zone controlatérale.

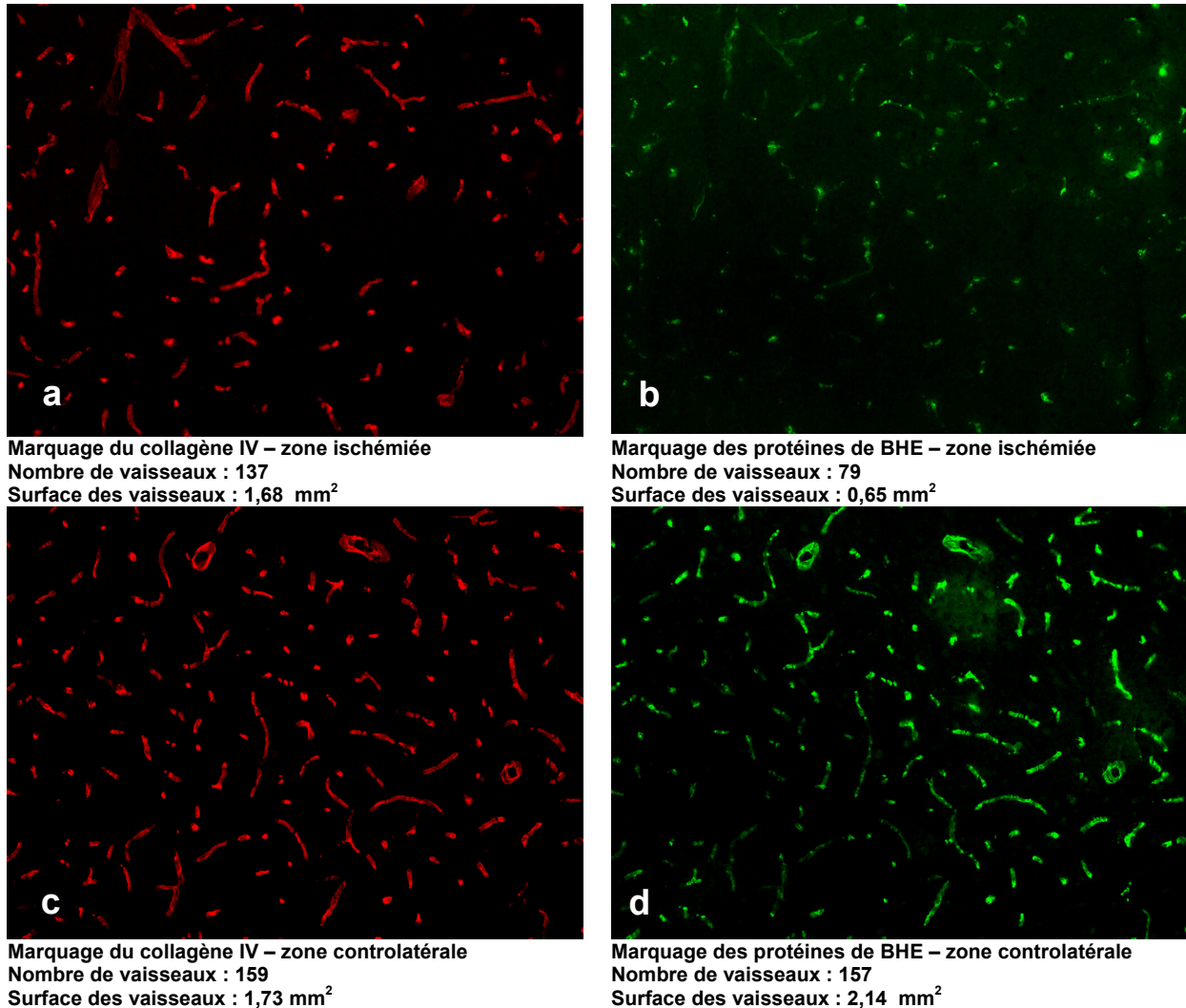


Figure 3.10 : Immunomarquages du collagène IV et des protéines de BHE dans le tissu sain et ischémisé d'un animal. a : Marquage du collagène IV – zone ischémisée ; b : Marquage des protéines de BHE – zone ischémisée ; c : Marquage du collagène IV – zone controlatérale ; d : Marquage des protéines de BHE – zone controlatérale.

Le marquage des protéines de BHE montre, quant à lui, des vaisseaux plus faiblement marqués voire absents, aux contours souvent diffus. Le nombre d'objets révélé par ce marquage est nettement inférieur à celui révélé par le marquage du collagène IV (79 vs 137 objets). Le rapport des surfaces des marquages protéines de BHE / collagène IV est de 0,39 dans l'hémisphère ischémisé et de 1,24 dans l'hémisphère sain.

La figure 3.11 montre les rapports des surfaces des vaisseaux BHE/COLL (surface des vaisseaux marqués par l'anticorps anti-protéines de BHE / surface des vaisseaux marqués par l'anticorps anti-collagène IV) pour chaque groupe de rats.

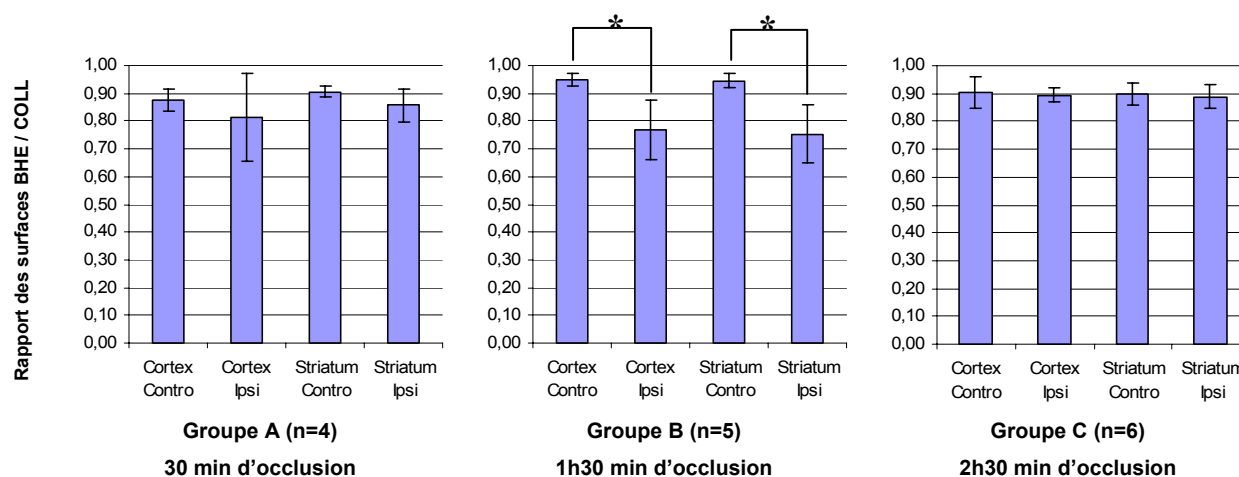


Figure 3.11 : Rapports des surfaces de vaisseaux BHE (visualisés par le marquage des protéines de BHE) / COLL (visualisés par le marquage collagène IV), dans le cortex controlatéral (contro) et ipsilatéral (ipsi) et dans le striatum controlatéral et ipsilatéral pour chaque groupe de rats. Moyenne \pm ET. La barre d'erreur représente un ET. * : Différence significative avec $P \leq 0,05$.

Aucune différence significative du rapport de surfaces BHE/COLL n'est observée entre les zones ipsilatérales et controlatérales pour les groupes 30 min et 2h30 min d'occlusion. Dans le groupe 1h30 min, une différence significative est observée entre les zones controlatérales et ipsilatérales du cortex et du striatum. La surface des vaisseaux marqués par l'anticorps anti-protéines de BHE est significativement plus petite que la surface marquée par l'anticorps anti-collagène IV.

3.4.3. Données d'imagerie.

La figure 3.12 montre les angiogrammes d'un cerveau de rat pendant l'occlusion de l'ACM et après la reperfusion chez le même animal. Le rétablissement d'un DSC dans l'ACM après le retrait du filament occlusif est mis en évidence.

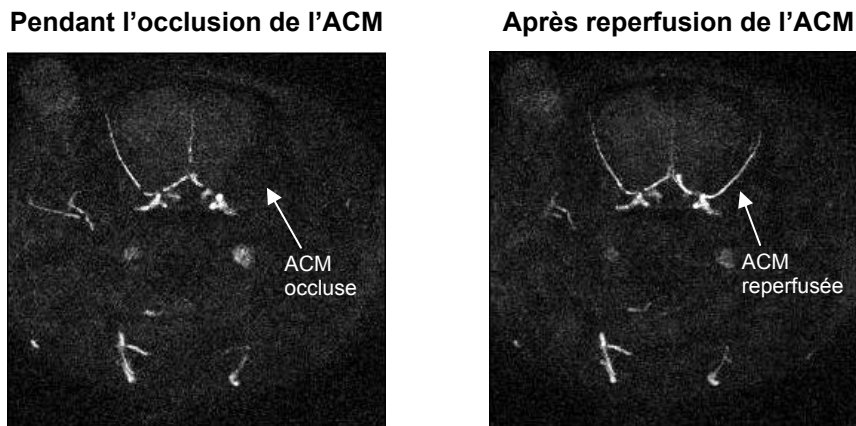


Figure 3.12 : Angiogrammes montrant l'occlusion et la reperfusion de l'ACM.

Le tableau 3.7 consigne les valeurs d'ADC obtenues dans les ROI ipsilatérales et controlatérales pour les rats des groupes B et C environ une heure après l'occlusion. Comme attendu, une chute de l'ADC est observée dans l'hémisphère ipsilatéral, à hauteur de 26,4% et 36,4% de la valeur controlatérale pour les groupes B et C respectivement.

	Groupe B		Groupe C	
	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral
ADC	0,68 ± 0,03	0,50 ± 0,14	0,70 ± 0,04	0,44 ± 0,07

Tableau 3.7 : Valeurs d'ADC ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) avant la reperfusion pour les groupes B et C.

La figure 3.13 montre des cartes d'ADC, des images $T_1 W$ après l'injection de MnCl_2 et après l'injection de MnCl_2 et Gd-DOTA, des cartes de T_1 et des images HE obtenues pour un animal représentatif du groupe A, du groupe B, et pour deux animaux représentatifs du groupe C. Ces images montrent que les régions présentant une baisse de l'ADC avant la reperfusion sont co-localisées avec les zones montrant des dommages tissulaires en histologie (figure 3.13 b r, c s, d t). Sur les images $T_1 W$, un rehaussement du signal est clairement visible dans les zones dépourvues de BHE comme les ventricules latéraux et le 3^e ventricule (figure 3.13 e-l). Aucune discordance spatiale entre les territoires rehaussés par le Mn^{2+} et les territoires rehaussés par le Gd-DOTA ne peut être mise en évidence. Le rehaussement est hétérogène spatialement à l'intérieur de la zone lésée, spécialement dans le cortex (figure 3.13 f, g, j, k).

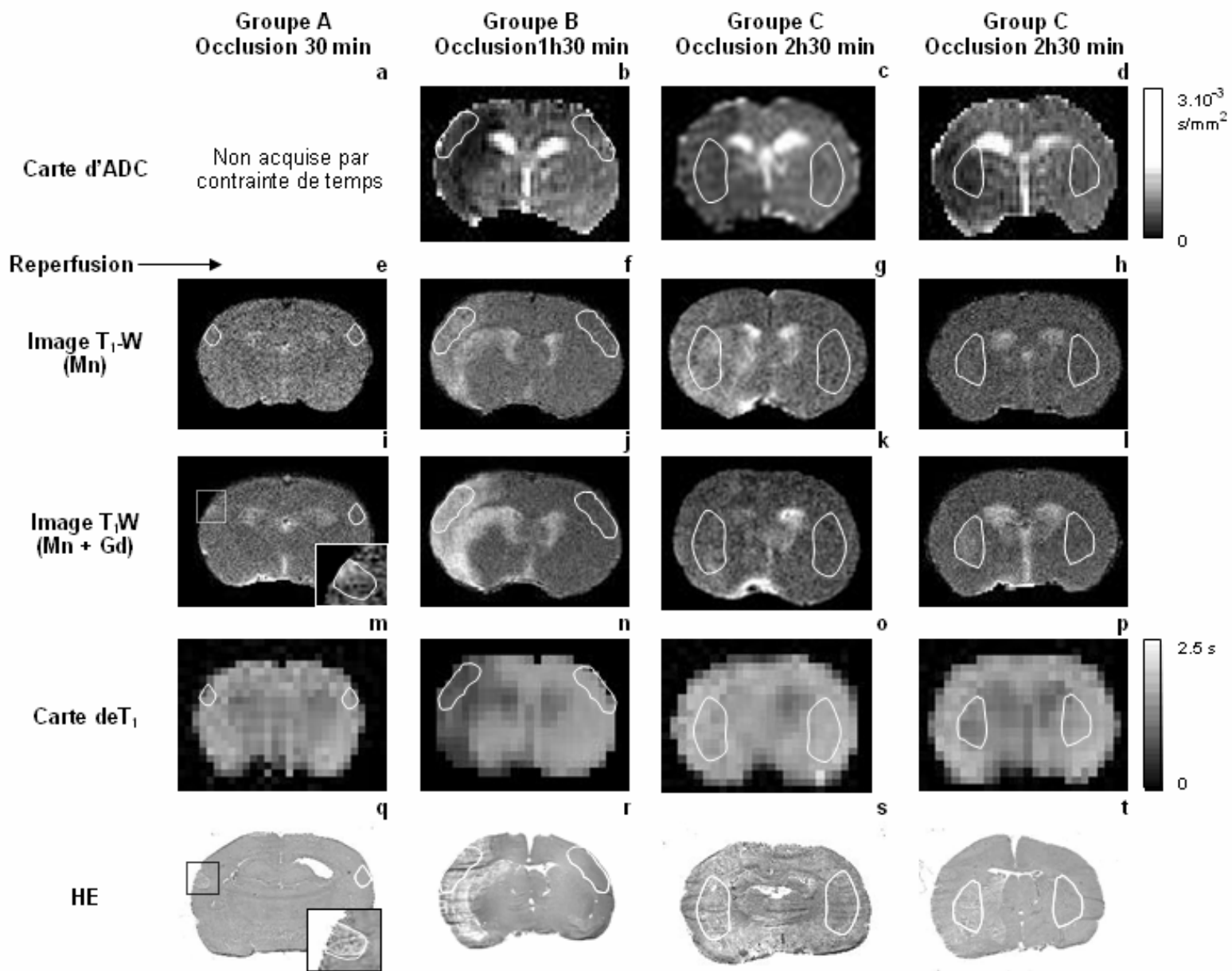


Figure 3.13 : Images représentatives obtenues pour un animal du groupe A (a, e, i, m, q), un animal du groupe B (b, f, j, n, r) et deux animaux du groupe C (c, g, k, o, s et d, h, l, p, t). Les cartes d'ADC ont été obtenues 1h après l'occlusion et avant la reperfusion et l'injection des agents de contraste. Les images pondérées T₁ ont été obtenues à 28 et 49 min après la reperfusion. Les cartes de T₁ sont les dernières acquises (48 min après reperfusion environ). Les ROI choisies sont délimitées en blanc. Résolution dans le plan 156x156 μm .

Les zones montrant un rehaussement de signal sur les images T_1W sont co-localisées avec les zones montrant un T_1 réduit sur les cartes de T_1 pour tous les rats des 3 groupes (excepté pour un rat du groupe A pour lequel une diminution de T_1 s'est produite sans visualisation de la zone en hypersignal). Une bonne correspondance entre les zones d'ADC réduit et les zones endommagées en HE est observée pour tous les rats du groupe A et B mais pour 6 rats seulement du groupe C. Pour le rat restant, une discordance spatiale entre la région montrant un T_1 réduit et les dommages observés en HE et sur les cartes d'ADC peut être mise en évidence (figure 3.13 d, p, t). Dans ce cas, l'aire endommagée en HE et ADC s'étend au-delà de l'aire montrant un T_1 réduit.

La figure 3.14 montre l'évolution des T_1 pour les 3 groupes dans les ROI ipsilatérales (triangles pleins) et controlatérales (triangles ouverts). Pour les animaux ne recevant pas d'agent de contraste (colonne de droite), la ROI controlatérale présente un T_1 stable et des valeurs de T_1 initiales après reperfusion homogènes entre groupes. Bien que les mesures initiales (7 min post-reperfusion) indiquent des valeurs de T_1 similaires entre groupes dans l'hémisphère ipsilatéral (environ 1800 ms, non statistiquement différent des valeurs controlatérales), l'évolution ultérieure diffère entre groupes. Les valeurs de T_1 ipsilatérales sont stables dans le groupe A alors qu'elles augmentent légèrement avec le temps dans les deux autres groupes. L'augmentation la plus importante (2.6 %) a lieu dans le groupe C. Pour les animaux recevant des agents de contraste (colonne de gauche), les injections de $MnCl_2$ et de Gd-DOTA conduisent à des réductions du T_1 dans les ROI ipsilatérales et controlatérales. Dans l'hémisphère controlatéral, les valeurs de T_1 chutent à l'arrivée de l'agent de contraste puis décroissent doucement après. Les profils d'évolution sont similaires entre groupes. Dans l'hémisphère ipsilatéral, les valeurs de T_1 chutent à l'arrivée de l'agent de contraste puis continuent à décroître rapidement avec des vitesses différentes selon les groupes.

Le tableau 3.8 et la figure 3.15 montrent les valeurs de T_1 à la fin de l'occlusion (1 mesure) et après la reperfusion (environ 8 min, moyenne des 7 premières mesures après l'angiographie et avant le début de l'infusion de $MnCl_2$) pour chaque groupe et pour les ROI ipsilatérales et controlatérales. Dans chaque groupe et pour chaque hémisphère, la reperfusion tend à diminuer le T_1 . Cette baisse est significative dans la ROI ipsilatérale et controlatérale pour le groupe C et dans la région controlatérale pour le groupe A.

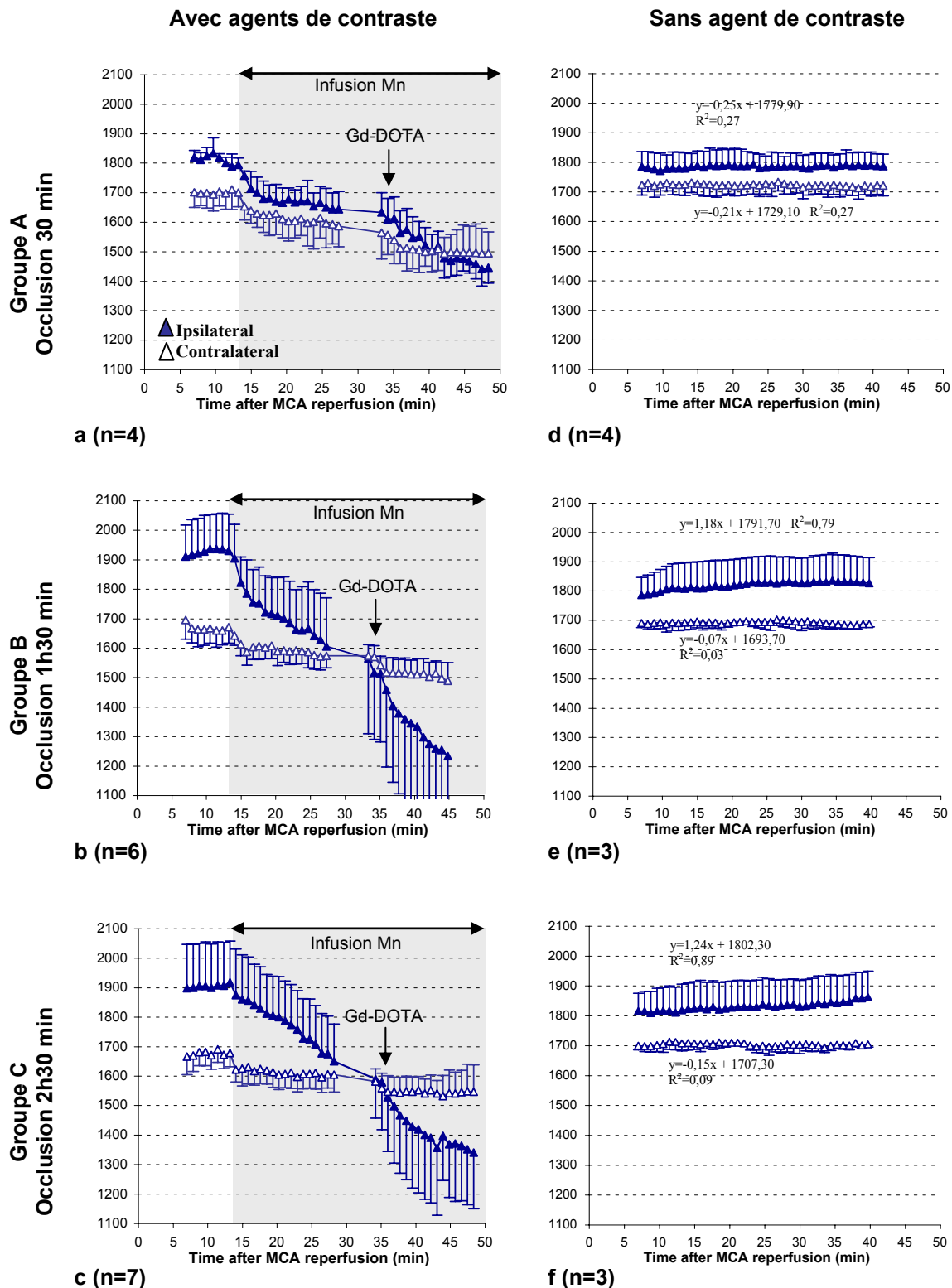


Figure 3.14 : Evolutions des T_1 (ms) dans les ROI controlatérales (triangles vides) et ipsilatérales (triangles pleins) pour les animaux qui ont reçu (colonne de gauche) ou non (colonne de droite) des agents de contraste. Le fond grisé représente la période d'infusion du $MnCl_2$ alors que les flèches indiquent l'injection du bolus de Gd-DOTA. Pour les groupes contrôles, les équations de régression linéaire et les coefficients de corrélation correspondants sont indiqués. Les barres d'erreur représentent un écart-type.

	Groupe A 30min MCAO		Groupe B 1h30 min MCAO		Groupe C 2h30min MCAO	
	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral
Fin de l'occlusion	1880 ± 115	1779 ± 42	1904 ± 90	1719 ± 74	1979 ± 107	1785 ± 67
Après reperfusion	1797 ± 44	1706 ± 39	1864 ± 113	1682 ± 43	1877 ± 132	1685 ± 54

Tableau 3.8 : Valeurs de T_1 (ms) avant et après reperfusion.

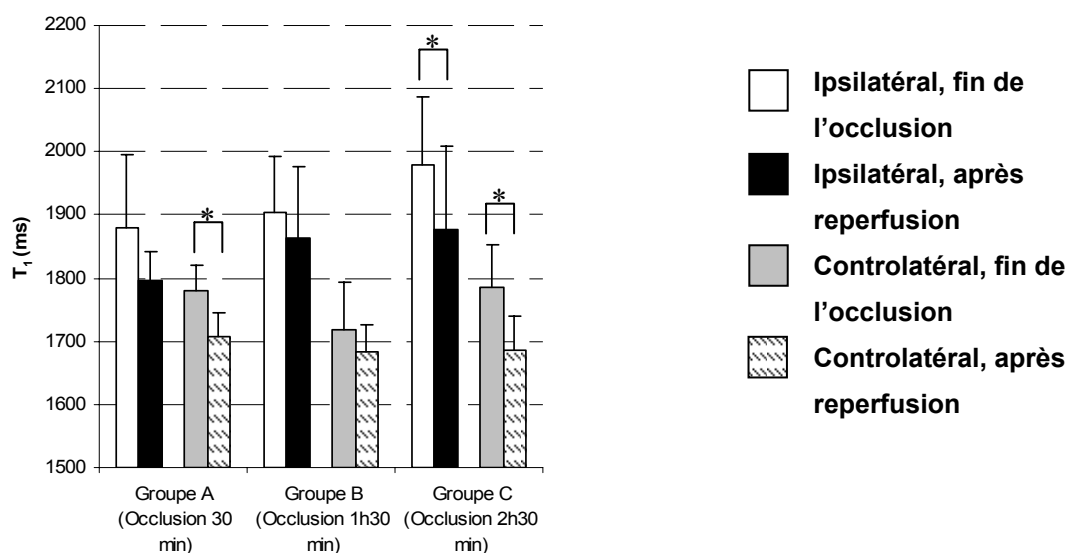


Figure 3.15 : Effet de la reperfusion sur le T_1 dans chaque groupe pour les ROI controlatérales et ipsilatérales. Les animaux ayant reçu des agents de contraste sont regroupés avec les animaux contrôle. Les barres d'erreur représentent un écart-type. L'astérisque dénote une significativité à $P \leq 0,05$.

3.4.4. Contenu tissulaire en eau.

La figure 3.16 montre le contenu tissulaire en eau à 2h15 min d'occlusion (striatum et cortex droits ischémiés et striatum et cortex gauches controlatéraux) pour le groupe ischémié ainsi que les valeurs correspondantes pour les animaux contrôle.

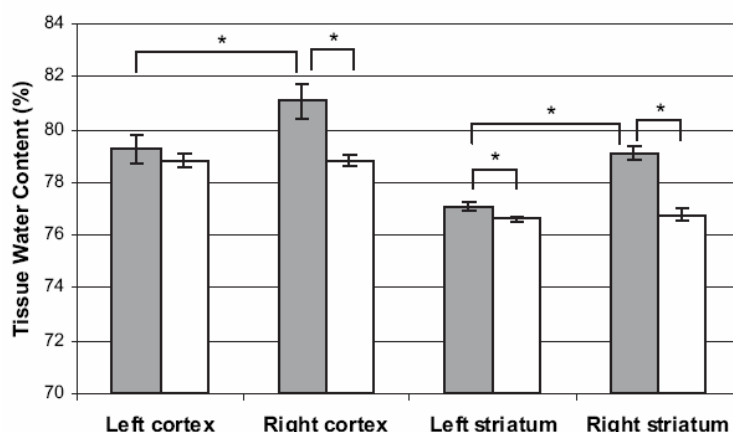


Figure 3.16 : Valeurs moyennes du contenu en eau à 2h15 min d'occlusion de l'ACM. Les barres grises représentent les animaux ayant subi l'ischémie cérébrale et les barres blanches, les animaux contrôle. La barre d'erreur représente un ET. * : différence significative à $P \leq 0,01$.

Chez les animaux ischémiés (barres grises), les deux régions ipsilatérales (cortex et striatum droits) montrent une augmentation significative du contenu tissulaire en eau (+2,4 % en moyenne), que l'on n'observe pas chez les animaux contrôle. La valeur du contenu en eau mesurée dans le striatum gauche des animaux ischémiés diffère de celle observée chez les animaux contrôle (+0,6 %). Cette différence reste faible par rapport aux variations du contenu en eau observées dans les zones ischémiées.

3.5. Discussion.

Dans ce modèle d'ischémie cérébrale, des altérations de la BHE sont visibles très précocement après la reperfusion, pour des temps d'occlusion de 30 min, 1h30 min et 2h30 min. Une bonne correspondance entre les zones lésées observées en HE et sur les cartes d'ADC, et les régions avec un T_1 réduit après injection d'agents de contraste a pu être mise en évidence. Les valeurs d'ADC pendant l'occlusion (tableau 3.7) et les valeurs de T_1 avant et après la reperfusion (tableau 3.8) sont en adéquation avec celles de la littérature^{18,19,113}.

Après l'occlusion, une nette augmentation du T_1 dans les régions ipsilatérales (figure 3.15, régions ipsilatérales vs controlatérales à la fin de l'occlusion) est observée.

Cette augmentation a déjà été reportée dans la littérature^{18, 63, 92, 113} et peut être expliquée par plusieurs facteurs :

1. La température cérébrale¹³¹. Il est connu que des variations de température peuvent entraîner des variations de T_1 . Dans notre cas, on pourrait supposer

que l'hémisphère ipsilatéral voit sa température diminuer après l'occlusion car le sang n'y afflue plus pour remplir son rôle de régulateur thermique, ce qui entrainerait alors une surestimation du T_1 .

2. L'oxygénation sanguine¹⁹⁸. Une hyperoxygénation (cas d'hyperventilation ou d'enrichissement du mélange inspiré en oxygène) peut influencer l'interprétation des valeurs de T_1 *in vivo* puisqu'il existe une relation linéaire entre la pression partielle en oxygène et le R_1 mesuré dans le sang. Dans notre étude, il est peu probable que ce paramètre ait influencé le T_1 car le mélange gazeux inspiratoire et les gaz du sang ont été contrôlés tout au long de l'expérience.
3. L'augmentation du contenu en eau du tissu pendant l'occlusion. Les mesures du contenu tissulaire en eau réalisées par gravimétrie sur la deuxième série d'animaux de notre étude¹⁹ suggèrent que l'occlusion de l'ACM conduit à une accumulation d'eau dans le tissu ischémié (figure 3.16). L'origine de cette accumulation n'est probablement pas une rupture de BHE puisqu'il est connu que celle-ci ne se manifeste qu'après plusieurs heures dans ce modèle d'ischémie cérébrale permanente. Deux autres hypothèses peuvent être défendues pour expliquer cette accumulation d'eau : (1) une augmentation transitoire de la perméabilité de la BHE aux molécules d'eau résultant d'un changement des gradients osmotiques entre les compartiments extra et intravasculaire suite à l'ischémie (origine vasculaire) et/ou (2) l'apparition d'un gradient osmotique entre le tissu ischémié et le tissu sain avoisinant (origine tissulaire) comme l'a déjà montré Symon et coll²⁰⁶ dans un modèle d'ischémie chez le babouin. Cette accumulation d'eau pourrait vraisemblablement expliquer l'augmentation du T_1 observée pendant la phase d'occlusion de l'ACM dans notre étude.

Après la reperfusion, une réduction du T_1 (entre 35 et 100ms environ) est observée dans les deux hémisphères. Cette réduction est surprenante mais peut être expliquée par les raisons suivantes :

1. Une impulsion RF non sélective a été appliquée avec l'antenne de volume pour empêcher les effets de débit sur les mesures de T_1 . Cependant, le volume sensible de la bobine ne couvre pas entièrement l'animal et seule la partie située entre la tête et le cœur est exposée à l'impulsion RF. Etant donné le T_1 du sang à 7T, l'aimantation non-inversée du sang arrivant de la partie

caudale de l'animal peut entrer dans le cerveau durant la mesure du T_1 et diminuer alors le T_1 apparent.

2. La réduction de T_1 est similaire dans les deux hémisphères alors que la restauration du DSC n'intervient que dans l'hémisphère ipsilatéral. Ce changement initial de T_1 ipsilatéral après la reperfusion a déjà été montré dans de précédentes études d'occlusion de l'ACM chez le rat ¹¹³ et est compatible avec la restauration du DSC et une hyperémie éventuelle. Concernant l'hémisphère controlatéral, une perfusion de luxe associée avec des changements d'activités métaboliques pourrait expliquer la réduction du T_1 ^{52,}

198

Après sa chute initiale à la reperfusion, le T_1 tissulaire reste stable dans l'hémisphère controlatéral pour les 3 groupes. Côté ipsilatéral, le T_1 reste stable pour le groupe A et augmente graduellement pour les groupes B et C (figure 3.14). Cette augmentation de T_1 témoigne d'une accumulation d'eau dans le tissu et peut être expliquée par l'ouverture de la BHE et l'apparition d'un œdème vasogénique suivant la reperfusion (comme le montre la réduction du T_1 chez les animaux recevant des agents de contraste). Dans les études de perméabilité réalisées avec des agents de contraste, cette augmentation naturelle du T_1 peut être masquée par la forte diminution du T_1 engendrée par l'injection d'un agent de contraste et conduire à des erreurs dans l'estimation de la perméabilité de la BHE. En effet, la réduction du T_1 après l'injection d'agent de contraste est due à l'effet combiné de l'extravasation de l'agent de contraste (diminution du T_1) et d'une accumulation d'eau (augmentation du T_1).

Dans notre étude, l'ouverture de la BHE après reperfusion est observée même après 30 min d'occlusion seulement. C'est le temps d'occlusion le plus court pour lequel une ouverture de la BHE a été observée en IRM à notre connaissance. Neumann-Haefelin et coll ¹⁵⁷ n'ont pas observé d'ouverture de la BHE dans des conditions expérimentales similaires mais ont utilisé une approche qualitative en imagerie T_1W plutôt qu'une approche quantitative par cartographie des T_1 . L'ouverture la plus précoce de la BHE au Gd-DTPA dans leur étude a été observée après 30 min de reperfusion suivant une période d'occlusion de 2h30 min. Les deux autres études ayant utilisé le même modèle que le nôtre ^{6, 109} ne confirment pas nos résultats mais ne sont pas non plus incompatibles puisque les durées de reperfusion étudiées sont plus longues et qu'on ne peut pas exclure alors que la BHE se soit ouverte une première fois puis refermée. D'autres études ont reporté des ouvertures précoces de BHE avec d'autres techniques (perméabilité à des colorants ⁷⁴, radiotraceurs ¹⁷⁴),

dans d'autres conditions expérimentales (modèle d'ischémie différent ¹⁷³), ou pour des durées d'occlusion et de reperfusion différentes ⁶. Celles-ci ont été résumées dans le tableau 3.3 qui témoigne d'une grande diversité de résultats.

Alors que les données IRM montrent une ouverture de la BHE pour les 3 groupes, cette observation n'est confirmée par l'analyse immunohistologique que pour le groupe B (1h30 min d'occlusion). Plusieurs raisons pourraient expliquer cette discordance :

- 1- Des erreurs méthodologiques sur le comptage du nombre et de la surface des vaisseaux. Le seuillage manuel des objets est dépendant de l'opérateur et peut induire des erreurs dans le comptage du nombre de vaisseaux, en particulier pour le marquage de l'antigène de la BHE, qui est moins intense que le marquage du collagène IV et dont le seuillage est plus délicat. Dans les zones ischémiées où la BHE est altérée, le marquage des vaisseaux est faible et diffus. Dans ce cas, le seuillage peut faire apparaître plusieurs fragments de vaisseaux alors qu'il s'agit du même, conduisant ainsi à une surestimation du nombre d'objets. Concernant le calcul de la surface des objets, leurs contours (et donc leurs surfaces) sont également dépendants du seuillage qui fait apparaître des objets plus ou moins épais.
- 2- Le choix de l'anticorps utilisé pour estimer la perméabilité de la BHE est également à discuter. On peut penser que le triplet protéique antigénique reconnu par l'anticorps utilisé n'est pas un bon indicateur de l'intégrité de la BHE ou que les modifications de la BHE induite par l'ischémie cérébrale n'affectent pas sa reconnaissance par l'anticorps. L'utilisation d'autres anticorps dirigés contre les protéines associées aux jonctions serrées (ZO-1, occludine, junctional adhesion molecule JAM) pourrait nous fournir d'autres renseignements sur l'ouverture de la BHE.
- 3- On ne peut pas exclure que l'augmentation de la perméabilité de la BHE observée puisse être associée à une augmentation de certains processus de transport, notamment de l'endocytose, sans changement de conformation des jonctions serrées ⁴⁰.

Notre travail montre une co-localisation des territoires dont le contraste est rehaussé par le Mn^{2+} et par le Gd-DOTA sur les images T_1W 45 minutes après la reperfusion environ. Il faut cependant noter que les deux agents de contraste n'ont pas été injectés en même temps (Gd-DOTA 20 minutes après le $MnCl_2$) et que ce décalage temporel a pu induire des différences dans leurs comportements. Pour essayer de mieux estimer la perméabilité de la BHE à chacun des traceurs, les concentrations apparentes en Mn^{2+} et en Gd-DOTA dans l'hémisphère ischémié ont été calculées en utilisant les équations décrites dans le paragraphe « Matériels et méthodes » de ce chapitre (tableau 3.9).

	Groupe A 30 min occlusion (n=4)	Groupe B 1h30min occlusion (n=6)	Groupe C 2h30min occlusion (n=7)
Ipsilatéral, $[Mn^{2+}]$ tissulaire à la fin de l'injection de $MnCl_2$ seul (avant bolus de Gd-DOTA)	10,9 ± 0,5	23,2 ± 0,6	20,9 ± 0,2
Ipsilatéral, $[Gd-DOTA]$ tissulaire à la fin de l'injection de $MnCl_2$+ Gd-DOTA	23,4 ± 2,3	44,8 ± 3,2	24,4 ± 1,0

Tableau 3.9 : Concentrations apparentes extrapolées en Mn^{2+} et Gd-DOTA (moyenne ± ET, $\mu mol/l$) dans l'hémisphère ipsilatéral pour chaque groupe à la fin de l'expérience.

La concentration apparente en Mn^{2+} à la fin de l'expérience a été estimée par extrapolation linéaire du T_1 entre 17 et 33 min après reperfusion. Le rapport calculé entre les concentrations apparentes de Gd-DOTA et de Mn^{2+} ainsi estimées est de 2,1 pour le groupe A, 1,9 pour le groupe B et 1,2 pour le groupe C (rapport moyen des 3 groupes = 1,7). Le rapport calculé à partir des quantités injectées (63 μmol de Gd-DOTA et 40 μmol de Mn^{2+}) est d'environ 1,6 pour les trois groupes. Si on considère que l'espace vasculaire dans le reste du corps est perméable de la même façon au Gd-DOTA et au Mn^{2+} (ou moins perméable au Gd-DOTA qu'au Mn^{2+}), ce rapport suggère alors que la BHE serait autant voire plus perméable au Gd-DOTA qu'au Mn^{2+} . Ces résultats ne concordent pas avec d'autres études sur la perméabilité qui ont montré que des petites molécules traversaient plus rapidement la BHE que de gros traceurs^{74,168}. Deux raisons peuvent expliquer cette différence :

1. Dans le sérum, le Mn^{2+} existe sous plusieurs formes : lié à l'albumine (84 %), sous forme hydraté (6,4 %), complexé à HCO_3^- (5,8 %), complexé au citrate³⁻ (2 %) et avec d'autres petits ligands (1,8 %) ⁴⁴. Il est estimé que moins d'1 % du Mn^{2+} entrant dans la circulation sanguine reste sous forme divalente libre. De ce fait, la différence de poids moléculaire entre le complexe Mn-albumine

(66 kDa) et le Gd-DOTA (590 Da) pourrait expliquer les différences de perméabilité observées dans notre étude. Cependant, le T_1 a été rapidement réduit dans les ventricules lors de l'infusion de $MnCl_2$. Cette observation est plutôt en faveur d'une fraction de Mn^{2+} libre importante.

2. Une différence dans le mode d'injection (bolus vs infusion) des deux traceurs. Le bolus permet d'atteindre une concentration tissulaire d'agent plus élevée que la même dose infusée²¹². Cette différence dans la méthode d'injection peut être à l'origine d'une surestimation de la concentration apparente en Gd-DOTA par rapport à celle du Mn^{2+} mais ce rapport ne peut pas être estimé.

Après l'injection des agents de contraste, les images T_1W comportent des hétérogénéités spatiales dans les zones de rehaussement du contraste et spécialement dans le cortex. Les causes de ces inhomogénéités peuvent refléter des différences dans l'accumulation du Gd-DOTA et du Mn^{2+} , des différences de relaxivités ou une combinaison de ces deux facteurs^{126, 203}. Physiologiquement, plusieurs facteurs comme des différences dans la distribution des vaisseaux et des différences tissu-spécifiques de l'épaisseur ou de la structure des parois vasculaires peuvent expliquer ces inhomogénéités⁸. La rupture de la BHE dépend du niveau de DSC atteint pendant la phase d'occlusion. Le DSC critique pour lequel l'œdème se développe chez les modèles animaux est d'environ 15 à 30 ml/100g/min¹³. Des variations de perfusion à l'intérieur de la zone ischémique pourraient être à l'origine de variations d'ouverture de la BHE et donc de quantités d'agents de contraste accumulées. Les observations microscopiques réalisées dans notre étude n'ont pas permis d'observer de telles caractéristiques permettant d'expliquer ces variations du contraste dans la zone lésée.

L'analyse de nos images ne révèle aucune différence spatiale entre la zone lésée observée en HE et sur les cartes d'ADC et les aires montrant des T_1 réduits pour tous les rats excepté un animal du groupe C. Cet animal montre, sur les images T_1W , une zone de rupture de la BHE plus petite que la zone lésée en HE et imagerie de diffusion. Durant la phase aiguë de l'ischémie, correspondant à la fenêtre d'administration du traitement thrombolytique, la zone lésée visualisée sur la carte d'ADC est considérée comme prédictive de l'infarctus final si aucun traitement n'est mis en place. Les cartes de T_1 obtenues après injection d'agent de contraste montrent quant à elles les zones à risque de transformation hémorragique^{120, 156}. La comparaison de ces deux types de cartes pourrait présenter un intérêt potentiel en clinique pour identifier les patients chez qui un traitement thrombolytique pourrait être appliqué avec un risque minimal de transformation hémorragique. Les patients

présentant une zone de T_1 réduit plus petite que la zone d'ADC réduit pourraient tolérer l'administration d'un traitement thrombolytique au-delà de la fenêtre temporelle couramment observée avec le rt-PA, contrairement aux patients présentant des zones identiques et pour qui le rapport du bénéfice sur le risque au-delà des 3 heures n'est déjà plus en faveur d'une intervention thérapeutique à cause du risque hémorragique.

En conclusion, ce travail a démontré que l'ouverture de la BHE dans ce modèle d'ischémie cérébrale, étudiée par l'extravasation d'agents de contraste, intervient au cours de la première heure de reperfusion même après une période d'occlusion courte de 30 minutes. La perméabilité de la BHE au Gd-DOTA et au Mn^{2+} apparaît équivalente, malgré la plus petite taille de ce dernier. La zone d'ADC réduit pendant l'occlusion semble correspondre à la zone de rupture de la BHE induite par la reperfusion. Sachant que l'ouverture de la BHE chez l'homme est associée à la thrombolyse et représente un risque de transformation hémorragique et de mauvais pronostic, et faisant l'hypothèse que cette ouverture intervient aussi de façon suffisamment précoce après la reperfusion ¹²⁵ (donc proche de la fenêtre thérapeutique actuelle), on pourrait profiter de cette ouverture pour administrer un traitement visant à réduire les complications de la thrombolyse ou élargir la fenêtre thérapeutique. Cependant, des difficultés persistent pour extrapoler ces résultats obtenus sur un modèle expérimental à la pathologie humaine. Comme mentionné précédemment, une différence importante résulte de la nature de la reperfusion qui est un processus lent en cas de reperfusion spontanée ou induite par le rt-PA en clinique, alors qu'elle est soudaine au retrait du filament chez l'animal dans ce modèle. Cette brusque restauration du DSC et son hyperperfusion post-ischémique associée peut exagérer la rupture de la BHE, en particulier sur des temps d'occlusion suffisamment longs pour induire des dommages au niveau des cellules endothéliales. De plus, d'autres effets adverses spécifiques de l'action pharmacologique du rt-PA, comme la fragmentation du caillot et la micro-embolisation de petites artères en aval, ne peuvent pas être reproduits dans ce modèle d'occlusion-reperfusion mécanique.

Chapitre 4 : Evaluation de l'influence de différents anesthésiques sur le développement de l'ischémie cérébrale focale transitoire chez le rat.

4.1. Introduction bibliographique : Anesthésie et neuroprotection.

4.1.1. Situation du sujet.

La reperfusion par thrombolyse grâce au rt-PA est actuellement le seul traitement validé dans l'ischémie cérébrale. Malheureusement, l'expérience a montré que sa sécurité d'emploi restreignait son utilisation à un nombre limité de patients. D'autres pistes médicamenteuses sont donc activement recherchées pour palier à ce manque thérapeutique. De nombreuses études cliniques de phase III ont évalué plus de 50 agents neuroprotecteurs mais se sont soldées par des échecs (tableau 4.1), bien que des études sur des modèles animaux aient préalablement démontré l'efficacité de ces molécules.

Produit	Mécanisme d'action	Résultat de l'étude
Nimodipine	Blocage des canaux calcium	Effets mitigés, non approuvé
Fosphenytoin	Blocage des canaux sodium	Phase III suspendue à cause du manque d'efficacité
BMS-204352	Ouverture des canaux potassium	Echec phase III. Seconde étude en cours
Selfotel	Antagoniste NMDA	Manque d'efficacité en phase III
Eliprodil	Blocage du site polyamine NMDA	Phase III abandonnée
Aptiganel	Blocage canaux NMDA	Pas d'efficacité en phase III
Gavestinel	Antagoniste glycine	Pas d'efficacité en phase III
Tirilazad	Inhibiteur de la peroxydation lipidique	Effets délétères
Lubeluzole	Blocage de l'oxyde nitrique	Pas d'efficacité en phase III
UK-279,276	Inhibition des neutrophiles	Echec en phase II
Trafermin	Facteur de croissance	Echec en phase II
Clomethiazole	Agoniste GABA	Echec en phase III

Tableau 4.1 : Etudes cliniques sur les agents neuroprotecteurs dans l'ischémie. NMDA : N-méthyl-D-aspartate ; GABA : acide gamma-aminobutyrique. D'après Davis ⁴⁶.

Bien que ces différences entre études cliniques et animales puissent être expliquées par plusieurs facteurs (fenêtre thérapeutique d'administration, dose, méthode d'évaluation, sélection des patients), elles soulignent le besoin d'une réévaluation critique de la méthodologie des études cliniques. Le groupe de travail STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) a dans ce sens édité des recommandations pour l'évaluation préclinique et clinique de nouveaux agents neuroprotecteurs, afin d'optimiser les chances de passage de l'animal à l'homme ⁴⁶. Une autre piste actuellement très à la mode en matière de neuroprotection est l'utilisation d'anesthésiques à visée curative ou prophylactique. Les anesthésiques sont potentiellement de bons candidats puisqu'ils sont capables de diminuer le

métabolisme cérébral, de s'opposer à l'excitotoxicité liée au glutamate et d'accroître l'inhibition de la transmission synaptique. Ils seraient donc capables de prolonger la durée pendant laquelle le cerveau pourrait tolérer une réduction de l'apport en oxygène. Cette voie thérapeutique est particulièrement étudiée pour toutes les situations cliniques qui représentent un fort risque d'ischémie cérébrale focale transitoire, comme l'endartérectomie carotidienne, la pose de clips sur des anévrismes cérébraux et la dérivation cardio-pulmonaire. Dans ce cas, les anesthésiques sont administrés à titre prophylactique pour induire un préconditionnement, phénomène au cours duquel des expositions à l'agent anesthésique procurent une plus grande tolérance à une exposition ultérieure à l'ischémie. Cette protection requière des cascades de réponses spécifiques au stimulus et s'opère par l'intermédiaire de molécules effectrices responsables d'un phénotype de tolérance (figure 4.1).

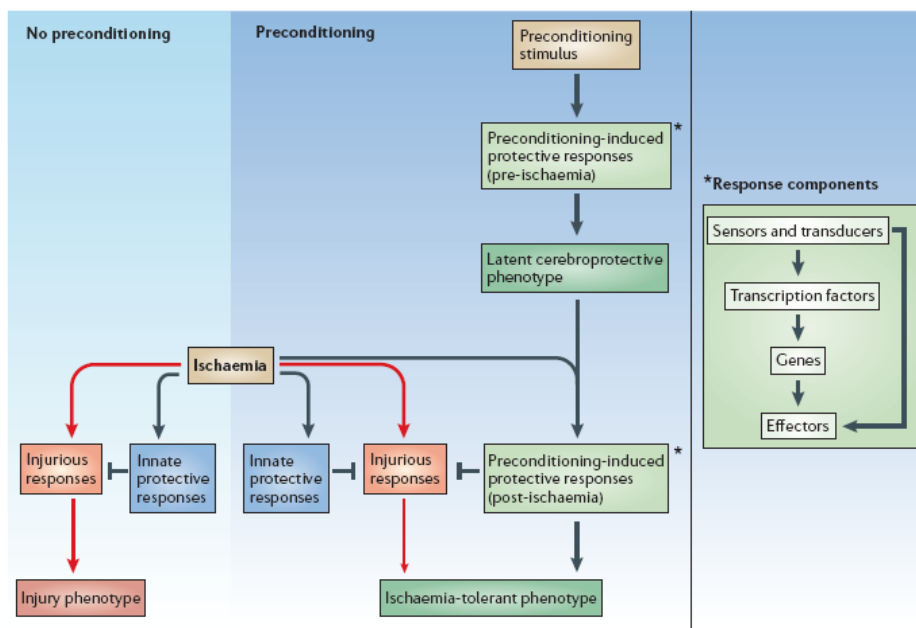


Figure 4.1 : Protection cérébrale par préconditionnement. D'après Gidday et coll⁷⁷.

Dans le cerveau non préconditionné, les réponses délétères induites par l'ischémie (flèches rouges), tempérées par des réponses protectrices innées, conduisent au phénotype ischémique lésionnel classique. Au contraire, le phénotype de tolérance à l'ischémie est le résultat de réponses protectrices pré et post-ischémiques induites par le préconditionnement (exposition à un anesthésique ou à des épisodes d'ischémies transitoires). Les réponses mises en jeu impliquent des cascades d'effecteurs produits de novo par modification de l'expression de gènes ou par l'activation de protéines déjà existantes. En médecine clinique, cette

propriété est largement appliquée en chirurgie myocardique ¹¹⁸. Le tableau 4.2 décrit des études menées chez l'animal en ce sens dans le cas de l'ischémie cérébrale. Ces études y sont classées par modèle d'ischémie (ischémies permanentes vs transitoires, globales vs focales), en fonction de la durée de préconditionnement et de la durée entre le préconditionnement et l'ischémie. Il en ressort globalement que le préconditionnement diminue le volume de l'infarctus ^{108, 236} et améliore les scores neurologiques ⁴². L'efficacité du préconditionnement varie en fonction de l'anesthésique utilisé mais il apparaît que les barbituriques (thiopental et methohexital) procure un bénéfice supérieur aux halogénés (halothane et isoflurane) en termes de réduction du volume de lésion ^{57 224, 235}.

La tolérance ischémique existe naturellement chez l'homme, sous la forme de brefs épisodes d'ischémie n'entraînant pas d'infarctus et appelés accidents ischémiques transitoires. Une analyse rétrospective de données cliniques sur l'ischémie cérébrale a d'ailleurs montré une réduction de la sévérité des accidents ischémiques avec antécédents d'accidents ischémiques transitoires ²²⁵. Le préconditionnement ne concerne logiquement pas la plupart des accidents ischémiques qui surviennent de façon fortuite et brusque. Cependant, l'étude de l'effet des anesthésiques administrés à titre de traitement au cours de la phase aiguë de l'ischémie présente deux intérêts. Le premier est thérapeutique et consiste à rechercher un potentiel bénéfice de l'utilisation d'un anesthésique sur l'issue neurologique finale de la maladie. Plusieurs études expérimentales chez l'animal ont tenté de répondre à cette question (tableau 4.3). D'après ces études d'ischémies cérébrales transitoires focales, malgré des durées d'occlusion et de reperfusion variables, il ressort que le propofol, l'isoflurane, l'halothane et le desflurane confèrent une neuroprotection lorsqu'ils sont administrés pendant la phase d'occlusion. Même si l'application de ces données expérimentales à la clinique est encore lointaine, ces résultats suscitent un intérêt d'étude croissant dans ce domaine.

Deuxièmement, à côté du versant neuroprotecteur recherché dans les études précliniques chez l'animal, un intérêt méthodologique émerge de ces constatations. Il apparaît important de considérer l'effet de l'anesthésique sur le modèle animal utilisé et ses conséquences pour la comparaison des résultats entre plusieurs études chez l'animal et lors du passage à l'étude clinique. En effet, la plupart des modèles d'ischémie cérébrale sont chirurgicalement invasifs et nécessitent une anesthésie générale. Or, il est bien connu que les paramètres physiologiques intra et post-ischémiques, en particulier la pression artérielle, le pH sanguin, les gaz du sang ³⁹, la température ¹⁶¹ et la glycémie ¹⁴⁵, déterminent de façon critique l'issue de l'ischémie cérébrale,

Article	Espèce et agent de préconditionnement	Durée de préconditionnement	Durée entre préconditionnement et ischémie	Anesthésique pendant l'occlusion	Modèle d'ischémie	Durée d'occlusion	Durée de reperfusion	Evaluation des dommages	Résultats
Zheng et coll, 2004 236	Rat Isoflurane 2 % - respiration artificielle	30 min	24 h	Idem préconditionnement	Focale Permanente Occlusion intraluminale de l'ACM	6 h 24 h 72 h 14 jours	Aucune	Volume de l'infarctus (VI) + Scores neurologiques	Pour toutes les durées de MCAO 1) VI isoflurane < VI contrôle non préconditionné 2) Le préconditionnement améliore les scores neurologiques
Kapinya et coll, 2002 108	Rat 1. Halothane 1,2 % (1,0 MAC) - respiration spontanée 2. Isoflurane 1,4 % (1,0 MAC) - respiration spontanée 3. Contrôle éveillé	3 h 3 h /	24 h 0, 12, 24, 48 h 24 h	Isoflurane 1,4 % - respiration spontanée	Focale Permanente Cautérisation de l'ACM après craniectomie + clampage des 2 carotides communes	60 min	4 jours	VI	VI isoflurane < VI halothane et contrôle éveillé pour toutes les durées de préconditionnement
Engelhard et coll, 1999 60	Rat – ventilation artificielle Induction Isoflurane 1,7 % puis 1. Fentanyl 25 µg/kg/h 2. Isoflurane 1,4 % (1,0 MAC) 3. Desflurane 5,7 % (1,0 MAC) 4. Desflurane 8,5 % (1,5 MAC)	30 min	0	Idem préconditionnement	Globale transitoire Occlusion d'une carotide commune + hypotension	30 min	72 h dont 30 min sous anesthésie	Scores neurologiques à 24, 48 et 72 h post-ischémie	L'isoflurane et le desflurane améliorent les scores neurologiques par rapport au fentanyl
Werner et coll, 1995 226	Rat– ventilation artificielle Induction Isoflurane puis 1. Fentanyl 25 µg/kg/h 2. 2 % sevoflurane (1,0 MAC) 3. 2 % sevoflurane (1,0 MAC) + 40 % glucose 6 ml/kg	30 min	0	Idem préconditionnement	Globale transitoire Ligature d'une carotide commune + hypotension	30 min	3 jours dont 30 min sous anesthésie	Scores neurologiques tous les jours pendant 3 jours	Le sévoflurane améliore les scores neurologiques pendant 3 jours comparé au fentanyl. La concentration plasmatique en glucose n'intervient pas dans cette neuroprotection.
Ergün et coll, 2002 62	Rat – respiration spontanée Induction Ketamine 90 mg/kg - xylazine 10 mg/kg puis 1. Propofol 50 mg/kg 2. Sérum physiologique	30 min	0	Uréthane 1,2 g/kg	Globale transitoire Occlusion 4 vaisseaux	30 min	60 min sous anesthésie	Quantification de la peroxydation lipidique	Le propofol diminue la quantité de lipides peroxydés par rapport au groupe contrôle (sérum physiologique)

Tableau 4.2 (1/2) : Données bibliographiques sur le préconditionnement anesthésique dans l'ischémie cérébrale. ACM : artère cérébrale moyenne ; MCAO : occlusion de l'artère cérébrale moyenne ; MAC : concentration alvéolaire minimale ; EEG : électroencéphalogramme ; VI : volume d'infarctus

Article	Espèce et agent de préconditionnement	Durée de préconditionnement	Durée entre préconditionnement et ischémie	Anesthésique pendant l'occlusion	Modèle d'ischémie	Durée d'occlusion	Durée de reperfusion	Evaluation des dommages	Résultats
Warner et coll, 1991 ²²⁴	Rat spontanément hypertendu Ventilation artificielle Induction Halothane 1 à 3% puis 1. Halothane 1,5 % (1,3 MAC) 2. Methohexital jusqu'à suppression des bouffées du tracé EEG 3. Isoflurane 1,9 % (1,3 MAC)	30 min	0	Idem préconditionnement	Focale transitoire Ligature de l'ACM après craniectomie	120 min	4 jours dont 50 min sous anesthésie	VI + scores neurologiques à 4 jours post-reperfusion	Le Vi est réduit sous methohexital mais pas sous isoflurane comparé à l'halothane. Les scores neurologiques sont uniformes entre les groupes.
Cole et coll, 2001 ⁴²	Rat spontanément hypertendu Ventilation artificielle Induction Isoflurane 1,4 % puis 1. Halothane 1,2 MAC 2. Thiopental jusqu'à suppression des bouffées du tracé EEG 3. Methohexital jusqu'à suppression des bouffées du tracé EEG 4. Pentobarbital jusqu'à suppression des bouffées du tracé EEG	30 min	0	Idem préconditionnement	Focale transitoire Ligature de l'ACM après craniectomie	180 min	120 min sous anesthésie	VI à 3 h post-reperfusion	Seul le thiopental réduit le VI comparé au témoin halothane.
Drummond et coll, 1995 ⁵⁷	Rat spontanément hypertendu Induction Isoflurane 1,8 % - respiration artificielle puis 1. Halothane 0,92 % (1,2 MAC, contrôle) 2. Thiopental jusqu'à suppression des bouffées du tracé EEG 3. Etomidate jusqu'à suppression des bouffées du tracé EEG 4. Isoflurane jusqu'à suppression des bouffées du tracé EEG	60 min	0	Idem préconditionnement	Focale Transitoire Occlusion de l'ACM par ligature après craniectomie	180 min	120 min sous anesthésie	VI à 5 h post-MCAO	VI thiopental < VI halothane VI isoflurane > VI halothane VI etomidate > VI halothane
Tsai et coll, 2004 ²¹³	Rat 1. Desflurane 5,7 % (1,0 MAC) - respiration spontanée 2. Desflurane 7,1 % (1,25 MAC) - respiration spontanée 3. Desflurane 8,6 % (1,5 MAC) - respiration spontanée 4. Chloral hydrate 400 mg/kg	2 h	0	Idem préconditionnement	Focale Transitoire Ligature de l'ACM après craniectomie + clampage des 2 carotides communes	60 min	24 h	VI à 24 h post-MCAO	Pour toutes les concentrations, VI sous desflurane < VI chloral hydrate

Tableau 4.2 (2/2) : Données bibliographiques sur le préconditionnement anesthésique dans l'ischémie cérébrale. ACM : artère cérébrale moyenne ; MCAO : occlusion de l'artère cérébrale moyenne ; MAC : concentration alvéolaire minimale ; EEG : électroencéphalogramme ; VI : volume d'infarctus.

Etude	Anesthésie	Espèce et modèle d'ischémie	Durée d'occlusion	Durée de reperfusion	Evaluation des dommages	Résultats
Gelb et coll, 2002 ⁷⁶	1. Propofol 25mg/kg/h dès l'induction de l'ischémie 2. Propofol 15mg/kg/h dès l'induction de l'ischémie 3. Propofol 25mg/kg/h 1h après l'induction de l'ischémie 4. Intralipide (groupe contrôle)	Rat Transitoire Focale Injection d'endothéline intracérébrale sur l'ACM dans une canule pré-implantée	Estimée à 1h par visualisation de l'ACM	3 jours	VI	VI propofol administré lors de l'occlusion ou 1h après < VI intralipide. La dose 25mg/kg/h de propofol est plus efficace que la dose 15mg/kg/h
Kawaguchi et coll, 2000 ¹¹²	Isoflurane 2,5% - ventilation artificielle jusqu'à l'occlusion puis 1. Arrêt de l'isoflurane pendant l'occlusion et reprise avant reperfusion 2. Poursuite de l'isoflurane 1,8% jusqu'à reperfusion	Rat Transitoire Focale Occlusion intraluminaire de l'ACM	70min	2 jours ou 14 jours	Scores neurologiques VI	VI Isoflurane < VI éveillé à 2 jours post-MCAO Scores neurologiques Isoflurane > scores neurologiques éveillé à 2 jours post-MCAO A 14 jours post-reperfusion, seule la nécrose neuronale sélective (mais pas l'infarctus total) est réduite
Zausinger et coll, 2002 ²³³	1. Atropine 0,5mg/kg + chloral hydrate 3,6% 1ml/100g – respiration spontanée 2. Atropine 0,5mg/kg + halothane 0,8-1,2% - respiration spontanée 3. Atropine 0,5mg/kg + halothane 0,8-1,2% - ventilation artificielle	Rat Transitoire Focale Occlusion intraluminaire de l'ACM	90min	7 jours	Volume de l'infarctus (VI)	VI chloral hydrate > VI halothane VI halothane en respiration spontanée > VI halothane en ventilation artificielle
Haelewyn et coll, 2003 ⁸²	1. Halothane 1,5-1,6% (2 MAC) – ventilation artificielle pendant chirurgie puis arrêt puis reprise avant reperfusion 2. Halothane 1,5-1,6% (2 MAC) – ventilation artificielle pendant chirurgie puis halothane 1,1-1,2% (1,5 MAC) jusqu'à reperfusion 3. Desflurane 11-12% (2 MAC) - ventilation artificielle pendant chirurgie puis arrêt puis reprise avant reperfusion 4. Desflurane 11-12% (2 MAC) - ventilation artificielle pendant chirurgie puis desflurane 8-9% (1,5 MAC) jusqu'à reperfusion	Rat Transitoire Focale Occlusion intraluminaire de l'ACM	2h	22h	VI	VI desflurane < VI halothane. L'anesthésie desflurane ou halothane) pendant la période d'occlusion réduit le volume d'infarctus comparé à l'état éveillé pendant l'occlusion.

Tableau 4.3 : Données bibliographiques sur l'administration d'anesthésiques au cours de la phase aiguë de l'ischémie cérébrale. ACM : artère cérébrale moyenne; MAC : concentration alvéolaire minimale ; VI : volume de l'infarctus.

Ces paramètres sont eux-mêmes directement liés à l'anesthésique et aux conditions expérimentales. L'étude de Zausinger et coll ²³³ montre que pour un même anesthésique, le volume d'infarctus induit sous respiration spontanée est supérieur à celui induit sous ventilation artificielle. L'effet bénéfique de certains anesthésiques vis-à-vis de l'ischémie cérébrale peut donc avoir un retentissement sur l'étendue de la lésion et le modèle utilisé.

4.1.2. Mécanismes d'action neuroprotecteurs des agents anesthésiques.

4.1.2.1. Anesthésiques volatiles halogénés.

La classe thérapeutique des agents halogénés utilisés en anesthésie comporte l'halothane et l'enflurane, largement supplantés par les agents plus récents comme l'isoflurane, le desflurane et le sévoflurane, moins solubles dans les tissus et mieux tolérés par le système cardiovasculaire. Le mécanisme précis par lequel les anesthésiques volatiles réduisent les dommages cérébraux au cours de l'ischémie n'est pas clairement identifié. Plusieurs études ont indiqué que ces anesthésiques pouvaient atténuer l'excitotoxicité en inhibant la libération de glutamate et sa réponse sur les récepteurs post-synaptiques. Beirne et coll ²³ ont examiné les effets de l'halothane sur l'excitotoxicité liée au NMDA sur des cultures primaires de neurones et ont démontré un antagonisme de l'anesthésique au niveau des récepteurs NMDA. L'isoflurane est capable de réduire les dommages corticaux liés au NMDA et à l'AMPA *in vivo* et de manière dose-dépendante ^{87, 115}. L'isoflurane peut également réduire la fréquence des dépolarisations transitoires ischémiques, qui sont responsables d'une augmentation de l'influx de calcium dans les neurones et d'une aggravation des dommages ¹⁶⁴. Un autre mécanisme potentiel de neuroprotection alloué aux anesthésiques volatiles est leur influence sur le système sympathique. Mackensen et coll ¹⁴⁰ ont étudié la relation entre la réponse adrénergique et l'issue histologique dans l'ischémie globale chez le rat sous isoflurane. Ils ont démontré que l'isoflurane atténuait la réponse sympathique périphérique à l'ischémie et améliorait l'issue histologique comparé à une anesthésie au fentanyl. Ce bénéfice était inhibé par un agent bloquant des ganglions sympathiques. Dans une étude récente, Kawaguchi et coll ¹¹¹ ont montré que l'isoflurane retardait mais n'empêchait pas le développement de l'apoptose neuronale dans l'ischémie cérébrale focale chez le rat. En protégeant transitoirement les neurones, l'isoflurane allongerait ainsi la fenêtre thérapeutique d'administration d'autres médicaments réduisant les dommages neuronaux finaux.

En résumé, les halogénés agissent en diminuant l'excitotoxicité liée au glutamate, en réduisant la fréquence des dépolarisations ischémiques, en modulant la réponse du système sympathique et en retardant l'apoptose neuronale.

4.1.2.2. Barbituriques.

Les barbituriques (thiobarbital, pentobarbital, amobarbital, sécobarbital, phénobarbital, ...) appartiennent à une famille médicamenteuse agissant comme dépresseurs du système nerveux central, et dont le spectre d'activité s'étend de l'effet sédatif à l'anesthésie. Certains sont aussi utilisés pour leurs vertus anti-convulsivantes. Tous sont dérivés de l'acide barbiturique. De nombreuses études ont prouvé l'efficacité des barbituriques administrés avant, pendant ou après un épisode ischémique cérébral focal transitoire ou permanent chez l'animal ^{42, 57, 224}. Au contraire, l'efficacité neuroprotectrice des barbituriques dans l'ischémie cérébrale globale est controversée. Une étude récente de Amakawa et coll ⁷ a montré que le thiopental participe à la protection cérébrale au cours de l'ischémie mais que le traitement administré après le début des symptômes requière une dose plus importante qu'en préconditionnement. Chez l'homme au contraire, une étude clinique sur des patients comateux après arrêt cardiaque n'a montré aucun bénéfice du thiopental comparé à un traitement standard ³⁰. L'efficacité neuroprotectrice des barbituriques a été initialement attribuée à leur capacité de réduire le métabolisme cérébral mais plusieurs études ont démontré que cette dépression métabolique ne pouvait suffire à expliquer leur efficacité significative dans l'ischémie cérébrale. En effet, différents degrés de suppression du métabolisme cérébral obtenus par différentes doses d'anesthésiques n'induisent pas d'importantes différences dans la neuroprotection. De fortes doses administrées jusqu'à la suppression des bouffées d'ondes électroencéphalographiques ne sont pas nécessaires pour obtenir une protection maximale ^{189, 223}. De plus, des doses comparables de différents barbituriques ont une efficacité neuroprotectrice différente, ce qui suggère que d'autres mécanismes que la suppression métabolique sont mis en jeu ⁴². Les barbituriques bloquent la transmission glutamatergique aussi bien au niveau présynaptique que postsynaptique. Au niveau présynaptique, ils diminuent l'entrée de calcium induit par dépolarisation au chlorure de potassium dans les neurones cérébelleux en culture, ainsi que la libération de glutamate qui en résulte ¹⁵². Ils atténuent les effets toxiques du NMDA et de l'AMPA *in vitro* sur des coupes d'hippocampe de rat ²³⁷. Outre leur action sur la transmission glutamatergique, les barbituriques réduisent la fréquence des dépolarisations ischémiques transitoires au cours de l'ischémie focale ¹⁶⁴. Ils agissent comme piègeurs de radicaux libres puisque le thiopental est capable de protéger de façon dose-dépendante des

cultures primaires corticales et hippocampiques d'une cytotoxicité induite par le NO¹⁹⁵. Toutes ces actions sont susceptibles de participer à l'action neuroprotectrice des barbituriques.

En résumé, les barbituriques sont capables de réduire le métabolisme cérébral, diminuent l'excitotoxicité liée au glutamate et la fréquence des dépolarisations ischémiques.

4.1.2.3. Propofol.

Le propofol est un dérivé phénolique insoluble dans l'eau et présenté sous forme d'une émulsion lipidique. Il est considéré comme un anesthésique idéal en neurochirurgie grâce à ses effets bénéfiques sur la physiologie cérébrale (réduction du métabolisme cérébral, réduction du DSC). Des effets controversés sur la protection cérébrale ont émergé d'études *in vitro*. Alors que le propofol protège les cellules pyramidales CA1 de coupes d'hippocampe exposées à une privation de glucose et d'oxygène de 30 min dans l'étude de Adembri et coll⁵, il ne confère pas ce même bénéfice sur une expérience de même type avec une heure de privation dans l'étude de Feiner et coll⁶⁵. De façon similaire, des études *in vivo* sur des modèles d'ischémie cérébrale ont montré des résultats discordants. Le propofol semble capable de réduire l'étendue des dommages post-ischémiques dans des modèles d'ischémie transitoire^{76, 172} mais pas permanente^{5, 214}. Bon nombre de mécanismes ont été proposés pour expliquer les effets neuroprotecteurs du propofol. Parmi eux, le rôle antioxydant par piégeage direct des espèces réactives oxygénées et la diminution de la peroxydation lipidique a été démontré^{28, 229}. Sitar et coll¹⁹⁹ ont indiqué que le propofol pouvait prévenir et inverser l'inhibition de la recapture du glutamate induite par un stress oxydatif dans des astrocytes en culture, et donc empêcher l'augmentation du glutamate extracellulaire dans les synapses et son excitotoxicité. Dans un modèle *in vitro* d'anoxie-réoxygénation sur coupes de cerveaux de rat, De La Cruz et coll⁴⁸ ont montré que le propofol inhibait l'augmentation de la peroxydation lipidique et ont suggéré qu'il perturbait ainsi la chaîne de production d'autres radicaux libres potentiellement dommageables pour les membranes cellulaires. L'inhibition de la transmission synaptique modulée par le GABA et l'inhibition de la libération de glutamate sont deux autres mécanismes potentiels d'action du propofol. Le blocage de l'effet neuroprotecteur du propofol par un antagoniste du récepteur GABA_A suggère que l'activation de ce récepteur joue un rôle dans l'inhibition de la mort neuronale induite par l'ischémie cérébrale¹⁰⁴. D'autre part, la concentration tissulaire cérébrale de glutamate est diminuée par le propofol au cours de l'ischémie et lors de la reperfusion dans un modèle d'ischémie cérébrale

chez le rat⁵⁹. En résumé, le propofol possède des propriétés anti-oxydantes, diminue l'excitotoxicité liée au glutamate, réduit le métabolisme et le DSC cérébral.

4.1.2.4. Conclusion.

Dans les modèles animaux, après une courte période de récupération (généralement dans les quatre jours suivant l'ischémie), les anesthésiques volatiles, les barbituriques et le propofol peuvent réduire les dommages causés par l'ischémie cérébrale comparé avec l'état éveillé ou une anesthésie au fentanyl/N₂O. L'effet de ces agents semble préférentiellement dirigé contre les phénomènes excitotoxiques. Cependant, les dommages neuronaux observés plus tardivement (14 jours et plus) chez les animaux anesthésiés avec ces mêmes anesthésiques peuvent s'accroître si l'ischémie a été modérée à sévère au départ. Si l'ischémie a été brève au contraire, la maturation de ces dommages peut être inhibée grâce à ces anesthésiques.

4.2. Présentation et objectifs de l'étude.

Les propriétés vasodilatatrices de certains anesthésiques, notamment les agents volatiles halogénés, sont bien connues. Cependant, leurs effets sur le DSC intra-ischémique (pendant la phase d'occlusion) et post-ischémique (après reperfusion) au cours d'une ischémie cérébrale focale transitoire ont été peu étudiés ou rarement pris en compte. Administrés au cours de l'ischémie cérébrale, on peut supposer que ces médicaments puissent engendrer une augmentation du DSC pendant la phase d'ischémie et minimiser ainsi la sévérité de l'atteinte tissulaire. En effet, le rehaussement des seuils critiques de DSC pourrait favorablement réduire la zone de cœur ischémique qui est par définition une zone où le DSC est dramatiquement réduit. De plus, ces agents pourraient atténuer la sévérité du syndrome d'hypoperfusion post-ischémique. Cette phase, décrite dans des modèles d'ischémies focales et globales, résulte d'une résistance vasculaire augmentée survenant après la phase initiale d'hyperémie réactive. En augmentant le DSC pendant la période post-ischémique, les anesthésiques pourraient permettre une meilleure récupération neuronale durant la reperfusion. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet des anesthésiques sur le développement de l'ischémie cérébrale et d'observer parallèlement leur action sur le DSC. Nous nous proposons d'étudier l'effet de quatre anesthésiques fréquemment utilisés en clinique et en expérimentation animale (isoflurane, sévoflurane, propofol et thiopental) sur le DSC intra-ischémique à deux heures d'occlusion dans notre modèle d'ischémie cérébrale. En choisissant d'étudier la phase d'occlusion, nous souhaitons évaluer les

répercussions des anesthésiques sur le DSC et le développement des lésions indépendamment des modifications liées à la reperfusion. Le temps d'occlusion de deux heures a été choisi pour induire des dommages suffisamment importants et repérables sur une coloration histologique à l'HE. Il correspond à la fenêtre d'administration du traitement thérapeutique en clinique et au temps moyen couramment choisi pour les études sur l'ischémie transitoire dans notre laboratoire. Le DSC pendant la période d'occlusion est mesuré par la technique d'autoradiographie et corrélé avec l'état histologique du tissu déterminé par une coloration à l'HE.

4.3. Matériels et méthodes.

4.3.1. Modèle animal et protocole.

Le protocole de cette étude a été approuvé par le comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale Rhône-Alpes sous le numéro 079. Les expérimentations ont été menées sous les autorisations n° 380321 pour le chercheur impliqué, A3851610004 pour les locaux d'expérimentation et B3851610003 pour les locaux d'animalerie.

L'étude a porté sur un total de 24 rats mâles Sprague-Dawley de poids compris entre 290 et 340g (Elevage JANVIER, Le Genest St Isle, France), divisés en quatre groupes (n=6) en fonction du protocole anesthésique étudié :

- **Sévoflurane** (Sévorane[®], gracieusement fourni par les Laboratoires ABBOTT, France) administré à 1,3 MAC=2,6 % dans Air/O₂ (FiO₂=30 %).

- **Isoflurane** (Forène[®], Laboratoires ABBOTT, France) administré à 1,3 MAC=1,8 % dans Air/O₂ (FiO₂=30 %).

- **Propofol** (Diprivan[®], Laboratoires ASTRAZENECA, France) administré en bolus intrapéritonéal (IP) à 75 mg/kg puis infusé en intraveineux (IV) à 100 mg/kg par heure.

- **Thiopental** (Penthotal[®], Laboratoires ABBOTT, France) administré en bolus IP à 40 mg/kg puis infusé en IP à 60 mg/kg par heure.

L'équité des doses des différents anesthésiques est primordiale dans cette étude pour permettre leur comparaison en termes d'effet sur le DSC. Dans le cas des anesthésiques volatiles, la dose administrée est exprimée en MAC (Minimum Alveolar Concentration) ce qui rend la correspondance entre les différents anesthésiques aisée. La MAC chez l'homme est la concentration alvéolaire minimale requise pour que 50 % des patients ne bougent pas lors de l'incision chirurgicale.

Elle garantit un état anesthésique similaire entre les différentes molécules utilisées. Chez le rat, les anesthésiques volatiles sont couramment employés à la dose de 1,3 MAC pour la chirurgie. Pour garantir l'exactitude de la dose administrée, les évaporateurs à isoflurane (Datex-Ohmeda, Madison, USA) et sévoflurane (Dräger Medical, Lübeck, Allemagne, évaporateur prêté par les Laboratoires ABBOTT) ont été calibrés grâce à un analyseur de gaz halogénés (Dräger Medical 8050, Lübeck, Allemagne, gracieusement prêté par les Laboratoires ABBOTT) avant la série d'expériences. En ce qui concerne les agents anesthésiques injectables, les doses employées dans cette étude sont issues d'études animales de la littérature.

L'anesthésie a été induite directement par l'anesthésique étudié selon les doses mentionnées précédemment. Les rats ont été trachéotomisés et ventilés artificiellement grâce à un ventilateur contrôlé en volume (CWE Inc, Ardmore, USA) à une fréquence d'environ 60 cycles/min. La température corporelle de l'animal a été mesurée et maintenue à $37,1 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ à l'aide d'une couverture chauffante connectée à une sonde rectale (Panlab LSI Letica, Bioseb, France). La température du muscle temporal, indicatrice de la température cérébrale, a été maintenue à $36,7 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ à l'aide d'une lampe chauffante placée au dessus de la tête de l'animal et reliée à un thermocouple inséré dans le muscle ipsilatéral. L'artère fémorale droite a été canulée pour permettre l'enregistrement continu de la PAM et le prélèvement d'échantillons sanguins pour la mesure des gaz du sang (0,1 ml par échantillon, 3 prélèvements à 20, 70 et 110 minutes post-occlusion, analyseur ABL510, Radiometer, Copenhagen). L'artère fémorale gauche a été canulée avec un cathéter en polyéthylène PE10 (Portex Limited, Hythe, UK, diamètre intérieur : 0,28 mm) pour permettre l'échantillonnage sanguin lors de l'injection du traceur autoradiographique. L'emploi d'un cathéter de faible diamètre a permis de réduire le volume mort et la quantité de sang prélevée (environ 100 μl par rat en moyenne). La veine fémorale droite a été canulée avec un cathéter en polyéthylène PE50 (Portex Limited, Hythe, UK, diamètre intérieur : 0,58 mm) pour l'infusion du traceur autoradiographique et de propofol. Un cathéter IP a été implanté pour le groupe thiopental. L'ischémie cérébrale focale a été induite pendant 2 heures par occlusion intraluminale de l'ACM droite selon le protocole déjà décrit au chapitre 2. Le DSC a été mesuré à deux heures d'occlusion de l'ACM.

4.3.2. Mesure du DSC par autoradiographie.

Cette technique a été développée au laboratoire par Emmanuel Barbier et Régine Farion grâce à l'amicale collaboration d'Astrid Nehlig qui leur a enseigné les principes de mesure et le protocole expérimental à Strasbourg.

4.3.2.1. Principe de la mesure.

Une méthode pour la détermination quantitative du DSC dans le cerveau a été pour la première fois décrite par Kety et coll en 1960¹¹⁴. Elle est basée sur le principe d'échange d'un gaz inerte entre le sang et le tissu et a été adaptée par Sakurada et coll¹⁸³ pour l'utilisation de ¹⁴C-iodoantipyrine, traceur radioactif parfaitement diffusible. La détermination du DSC est obtenue en utilisant l'équation suivante développée par Kety :

$$Ci(T) = \lambda k \int_0^T Ca(t) \exp(-k(T-t)) dt$$

où $Ci(T)$ est la concentration tissulaire de ¹⁴C-iodoantipyrine au temps T ; T est le temps de la mort de l'animal ; 0 est le temps du début de l'injection du traceur ; λ est le coefficient de partition tissu :sang égal à 0,8 ml/g pour la ¹⁴C-iodoantipyrine ; Ca est la concentration du traceur dans le sang artériel au temps t et k est une constante définie comme $k = m \text{ DSC} / \lambda$. DSC est le débit sanguin par unité de masse de tissu et m est la fraction d'extraction égale à 1 pour la ¹⁴C-iodoantipyrine (parfaitement diffusible). En mesurant $Ci(T)$ à partir des coupes de tissu, $Ca(t)$ à partir des échantillons sanguins et connaissant λ et T , il est possible d'en déduire la valeur de k puis celle du DSC.

4.3.2.2. Protocole.

Une solution saline de ¹⁴C-iodoantipyrine (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) à 25 $\mu\text{Ci/ml}$ a été préparée. La ¹⁴C-iodoantipyrine a été injectée par voie IV à l'animal pendant 1 minute à un débit croissant de 60 ml/h jusqu'à 90 ml/h, à l'aide d'un pousse-seringue (KDS50, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Pendant la durée de l'infusion, des échantillons de sang artériel (environ 5 μl) ont été prélevés toutes les 3 secondes dans des capillaires héparinés. A la fin de la minute, le rat a été euthanasié par décapitation, son cerveau a été rapidement prélevé, congelé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C .

La fonction d'entrée artérielle (figure 4.2) a été déterminée à partir des concentrations de ¹⁴C-iodoantipyrine dans les prélèvements sanguins.

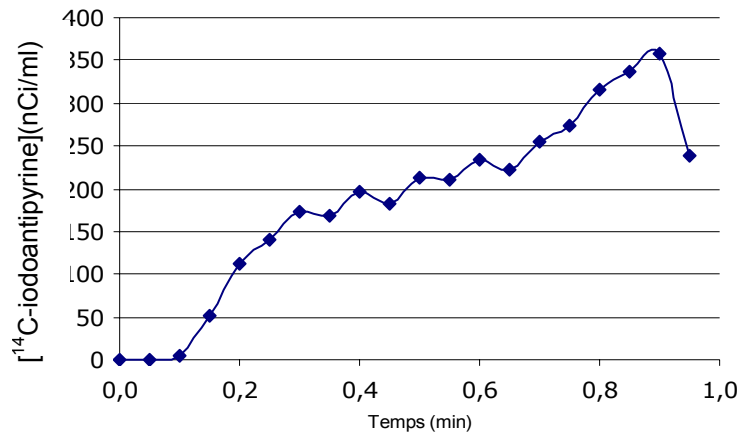


Figure 4.2 : Exemple de graphique représentant la fonction d'entrée artérielle pour un rat.

Celles-ci ont été mesurées par comptage à scintillation, après soufflage du contenu des capillaires dans des fioles remplies de liquide scintillant. Le nombre de désintégrations par minute (dpm) a été converti en concentration suivant la formule suivante :

$$\text{Concentration (nCi / ml)} = \frac{\text{dpm}}{2220} \times \frac{\text{densité du sang (g / ml)}}{\text{poids du sang (g)}}$$

Le poids du sang a été déterminé par la différence du poids des fioles contenant sang + liquide scintillant et du poids des fioles contenant le liquide scintillant uniquement. La densité du sang est de 1,06 g/ml et 1 nCi=2220 dpm par définition.

Pour mesurer la concentration de ¹⁴C-iodoantipyrine dans le tissu cérébral, 10 coupes de 16 μm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryotome (HM560, Microm Microtech, Francheville, France). Ces coupes ont été choisies dans le territoire de l'ACM et positionnées à bregma +3,2 mm, +2,2 mm, +1,2 mm, +0,2 mm, -0,3 mm, -1,3 mm, -2,3 mm, -3,3 mm, -4,3 mm et -5,3 mm en se référant à l'atlas stéréotaxique du cerveau de rat ¹⁶⁶. Un film autoradiographique Kodak Biomax (Eastman Kodak Company, New York, USA) a été exposé à ces coupes ainsi qu'à un standard de calibration pendant 6 jours à température ambiante, puis développé. Les films ont été numérisés à l'aide d'un scanner (Epson 4870 Photo, Seiko Epson Corporation, Nagano, Japon) (figure 4.3).

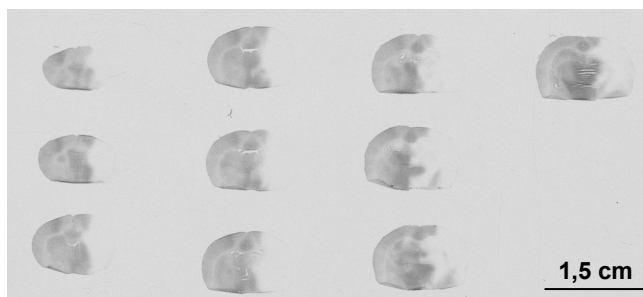


Figure 4.3 : Photo montrant les 10 coupes autoradiographiques pour un même rat.

Grâce au logiciel de traitement d'image Image J (National Institutes of Health, USA), des mesures de densité optique (DO) ont été effectuées sur les images numérisées et converties en concentrations tissulaires de ^{14}C -iodoantipyrine grâce au standard de calibration. Pour cela, une courbe d'étalonnage représentant l'activité (nCi/g) en fonction de la DO a été tracée pour chaque film (figure 4.4).

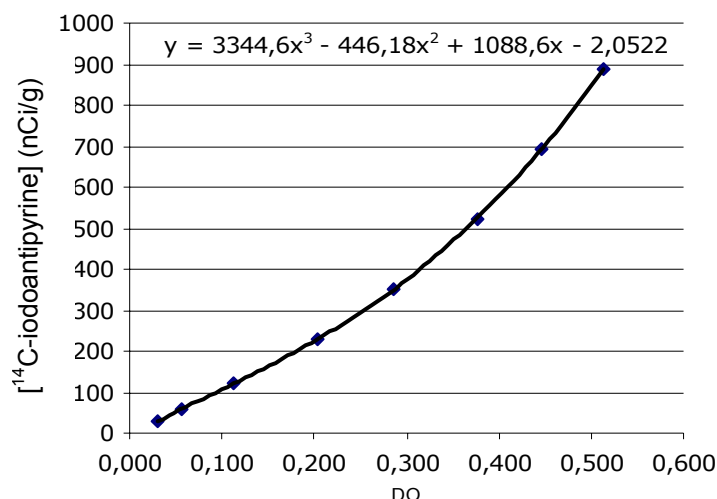


Figure 4.4 : Exemple de courbe d'étalonnage pour un film autoradiographique.

Un polynôme du troisième degré a été ajusté aux données et les constantes ainsi déterminées ont été utilisées pour calculer les concentrations de traceur dans le tissu à partir des DO mesurées sur les images numérisées. L'équation de Kety a pu ensuite être ajustée grâce à une macro Excel pour en déduire k et le DSC.

4.3.3. Coloration à l'hématoxyline-éosine.

Après exposition des films autoradiographiques, les coupes de cerveaux ont été fixées, colorées à l'HE puis numérisées (figure 4.5).

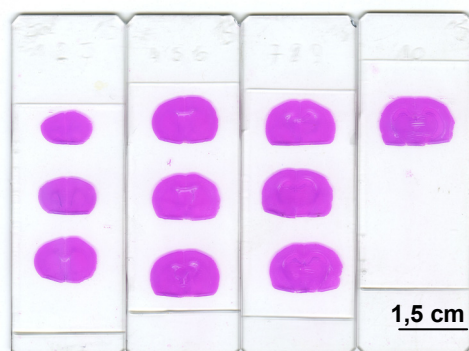


Figure 4.5 : Photo montrant les 10 coupes HE d'un même rat.

4.3.4. Traitement et analyse des données.

4.3.4.1. Choix des régions d'intérêt.

Trois ROI ont été délimitées sur chacune des 10 coupes HE (figure 4.6) :

- 1- La totalité de l'hémisphère ipsilatéral (ipsi, droit, siège de l'ischémie)
- 2- La totalité de l'hémisphère controlatéral (contro, gauche)
- 3- La région de l'hémisphère ipsi présentant visuellement des lésions ischémiques de type « œdème » après coloration à l'HE. Cette ROI a été dénommée « œdème »

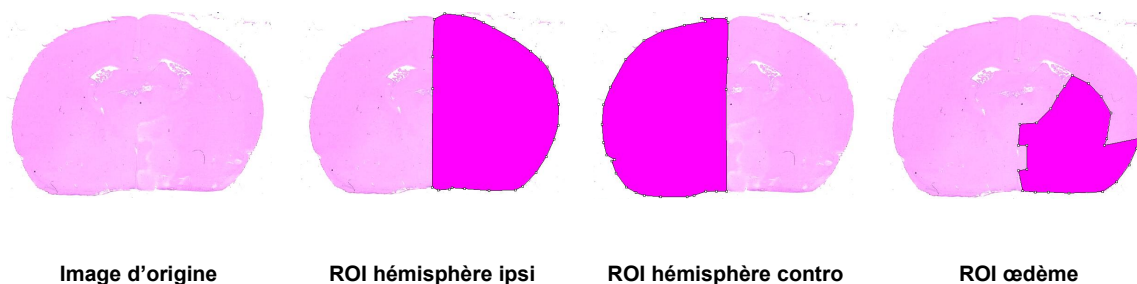


Figure 4.6 : Délimitation des régions d'intérêt (en rose) sur les coupes HE.

Quatre ROI ont été délimitées sur chacune des 10 coupes autoradiographiques (figure 4.7) :

- 1- La totalité de l'hémisphère ipsilatéral (ispi, droit, siège de l'ischémie)
 - 2- La totalité de l'hémisphère controlatéral (contro, gauche)
- Les ROI hémisphère ipsi et hémisphère contro sur les coupes autoradiographiques ont été obtenues par report de ces mêmes ROI provenant des coupes HE.
- 3- La région de l'hémisphère ipsi présentant visuellement une hypointensité par rapport à l'hémisphère contro caractérisant une diminution du DSC. Cette ROI a été dénommée « hypodébit ».

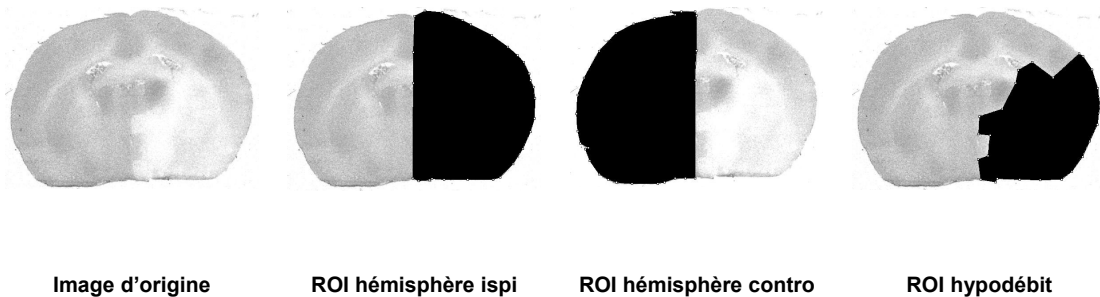


Figure 4.7 : Délimitation des régions d'intérêt (en noir) sur les coupes autoradiographiques.

- 4- Une région dénommée « mismatch » correspondant à une zone en hypodébit mais qui ne montre pas de dommage en HE (figure 4.8). Cette ROI a été déterminée à l'aide du logiciel Image J comme la différence entre la ROI hypodébit tracée sur l'image autoradiographique et la ROI œdème tracée sur l'image HE.

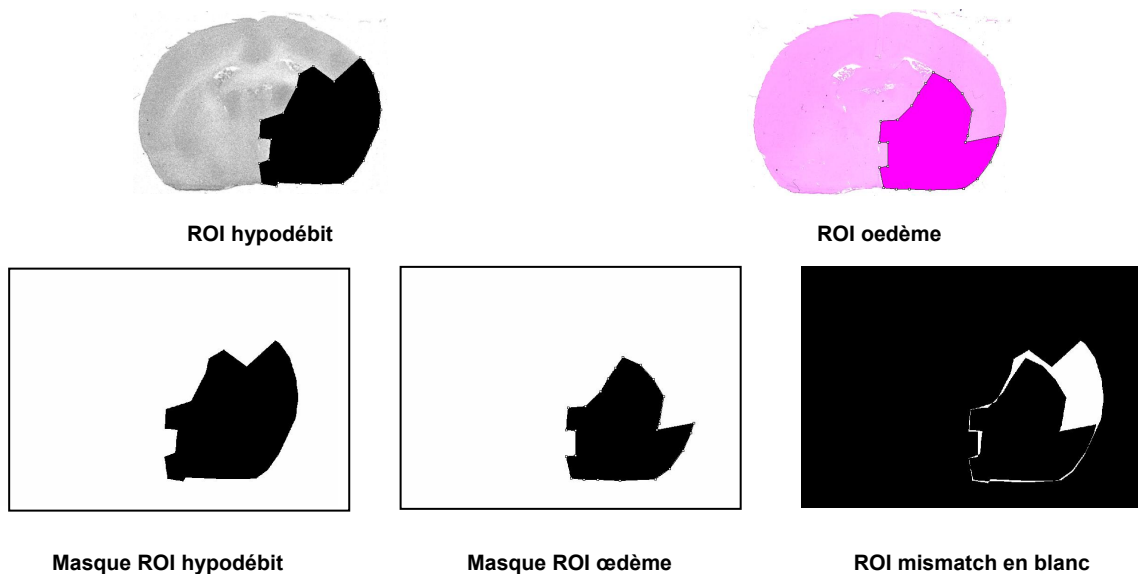


Figure 4.8 : Délimitation de la ROI mismatch (en blanc) résultant de la différence des masques ROI hypodébit et ROI œdème.

Pour les images HE et autoradiographiques, les aires correspondantes à chacune de ces ROI ont été calculées en pixels par le logiciel Image J. Elles ont été ensuite transformées en mm² d'après la résolution et la taille des images numérisées.

4.3.4.2. Correction des aires.

Pour tenir compte de la dilatation de l'hémisphère ischémié causée par l'œdème cérébral et observée après prélèvement du cerveau, un calcul correctif des aires est appliqué pour les ROI hypodébit, œdème et mismatch, selon la formule suivante :

$$\text{Aire corrigée de la ROI} = \frac{\text{Aire hémisphère gauche}}{\text{Aire hémisphère droit}} \times \text{Aire de la ROI}$$

4.3.4.3. Calcul des volumes d'intérêt (VOI).

Les VOI hémisphère contro, hémisphère ipsi, hypodébit, œdème et mismatch ont été calculés en additionnant les VOI élémentaires de chacune des 10 coupes. Le VOI élémentaire d'une coupe a été obtenu en multipliant la surface de la ROI (corrigée ou non) par la distance de la coupe considérée à la coupe suivante (0,5 ou 1,0 mm).

4.3.4.4. Calcul de la distribution des DSC par VOI.

Pour déduire les valeurs de DSC directement à partir des valeurs de DO, une courbe d'étalonnage représentant le DSC (calculé grâce à l'équation de Kety) en fonction des valeurs de DO issues des images autoradiographiques a été tracée pour chaque rat (figure 4.9). Les données ont été ajustées à un polynôme du 3^e degré dont les coefficients ont été déterminés. La distribution des DSC pour un VOI choisi a ensuite été calculée à l'aide d'un programme dédié (figure 4.10) développé sous le logiciel MATLAB[®] (The MathWorks Inc, USA). Les classes de DSC souhaitées, les coefficients du polynôme de la courbe d'étalonnage, l'épaisseur des coupes et le numéro des coupes à traiter sont rentrés manuellement par l'opérateur (figure 4.10 gauche). Les images autoradiographiques originales et leurs ROI ainsi que les cartes de DSC automatiquement générées sont visualisées (figure 4.10, droite). Les volumes totaux correspondants à chaque classe de DSC sont calculés et répertoriés dans un fichier Excel.

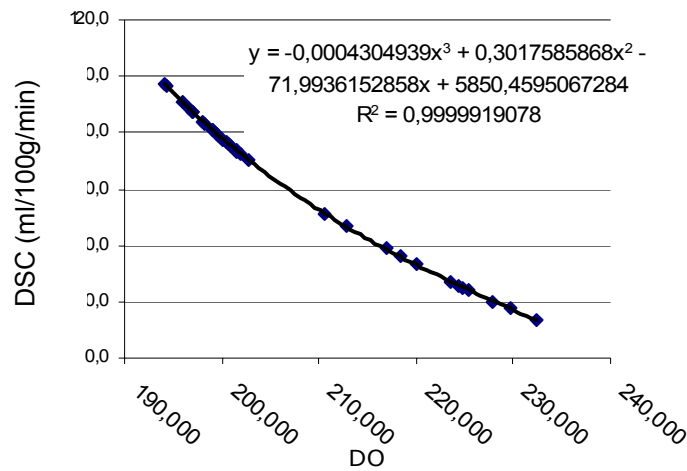


Figure 4.9 : Exemple de courbe d'étalonnage pour la détermination de la distribution des DSC pour un rat.

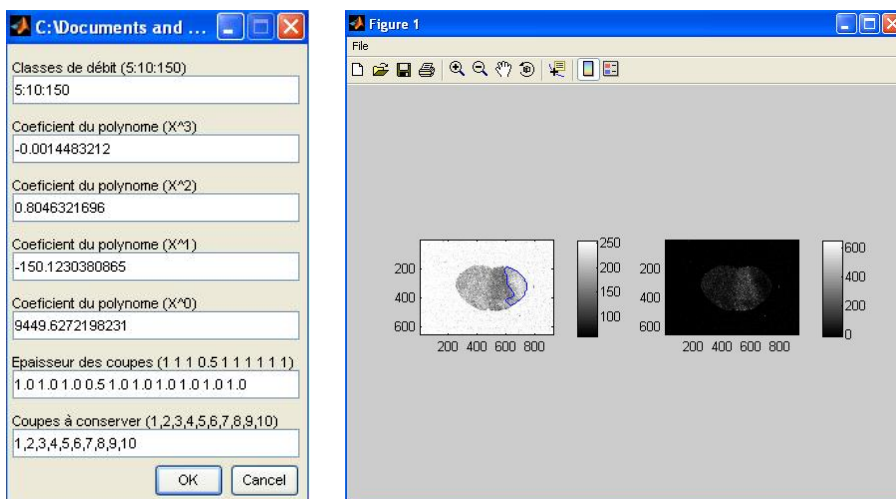


Figure 4.10 : Illustration du programme MATLAB développé pour calculer la distribution des DSC à l'intérieur d'un VOI.

4.3.4.5. Analyses statistiques.

Les données ont toutes été exprimées par leur moyenne \pm écart-type (ET). Des tests de Student non appariés ont été utilisés pour comparer les différents groupes. Des tests de Student appariés ont été utilisés pour comparer les hémisphères ipsilatéraux et contralatéraux. Le degré de significativité a été choisi à $P \leq 0,05$.

4.4. Résultats.

4.4.1. Paramètres physiologiques.

Le tableau 4.4 montre les paramètres physiologiques des animaux pour chaque anesthésique.

	Isoflurane n=6	Sévoflurane n=6	Thiopental n=6	Propofol n=6
Température corporelle moyenne (°C)	37,2 ± 0,5 ☼	37,4 ± 0,1 ☼	37,3 ± 0,1 ☼	36,9 ± 0,6
Température cérébrale moyenne (°C)	36,4 ± 0,5	36,9 ± 0,1	36,7 ± 0,3	36,7 ± 0,4
Pression artérielle moyenne (mm Hg)	75,3 ± 9,4 ^{ip, it}	80,6 ± 8,5 ^{sp}	92,2 ± 13,7	98,0 ± 18,6
PaCO ₂ (mm Hg) moyenne des 3 prélèvements	31,7 ± 10,1	35,1 ± 7,9	38,8 ± 5,3 ^{it, pt}	33,6 ± 4,8
PaCO ₂ (mm Hg) dernier prélèvement	31,5 ± 8,6	36,2 ± 9,1	41,6 ± 4,4 ^{it, pt}	34,9 ± 4,5
PaO ₂ (mm Hg) moyenne des 3 prélèvements	129,8 ± 29,5	160,6 ± 16,9 ^{sp, st, is}	129,5 ± 32,9	148,6 ± 36,4
pH artériel	7,45 ± 0,08	7,42 ± 0,07	7,38 ± 0,04 ^{it, pt}	7,41 ± 0,05
Hémoglobine (g/dl)	12,6 ± 1,0	11,4 ± 1,3 ^{is, sp, st}	13,1 ± 1,4	12,7 ± 1,3

Tableau 4.4 : Paramètres physiologiques (moyenne ± ET). ^{is}: isoflurane vs sévoflurane ; ^{ip}: isoflurane vs propofol ; ^{it}: isoflurane vs thiopental ; ^{sp}: sévoflurane vs propofol ; st: sévoflurane vs thiopental ; ^{pt}: propofol vs thiopental ; ☼: température corporelle vs température cérébrale.

Tous ces paramètres sont restés dans des limites acceptables tout au long de l'expérience et pour tous les rats, c'est pourquoi nous avons moyenné les valeurs des 3 prélèvements pour chaque rat. Cependant, des différences statistiques entre groupes sont observées. Les animaux sous thiopental ont une PaCO₂ plus élevée et un pH sanguin plus acide que les animaux sous isoflurane et propofol. La PAM est inférieure chez les rats sous isoflurane par rapport aux rats sous propofol ou thiopental, et inférieure chez les rats sous sévoflurane par rapport aux rats sous propofol. Les animaux sous sévoflurane ont une PaO₂ supérieure et une concentration en hémoglobine inférieure à ceux sous propofol, thiopental ou isoflurane.

4.4.2. Données HE.

4.4.2.1. Localisation des dommages ischémiques.

Tous les animaux de cette étude ont montré des signes d'ischémie cérébrale à l'analyse histologique des coupes HE. Ces dommages englobant le striatum latéral et le cortex du territoire de l'ACM (atteinte cortico-striatale) ou le striatum latéral seulement (atteinte striatale). Macroscopiquement, ces zones apparaissent d'une coloration plus pâle par comparaison à leurs homologues controlatérales, témoignant de la formation d'un œdème cérébral. Microscopiquement, on note dans ces zones la présence de quelques neurones dentelés et rétrécis, parfois éosinophiles, localisés principalement dans le striatum (chapitre 3, figure 3.9). Par comparaison, l'hémisphère controlatéral montre une coloration et des neurones intacts. Le tableau 4.5 montre la répartition des dommages induits par l'ischémie sur la base de l'étendue de l'œdème (striatal vs cortico-striatal) observé à deux heures d'occlusion de l'ACM pour chaque anesthésique.

	Isoflurane n=6	Sévoflurane n=6	Propofol n=6	Thiopental n=6
Atteinte striatale	4	2	2	2
Atteinte cortico-striatale	2	4	4	4

Tableau 4.5 : Localisation de l'atteinte ischémique observée à deux heures d'occlusion de l'ACM pour chaque anesthésique.

Les groupes sévoflurane, propofol et thiopental montrent 2 atteintes striatales pour 4 atteintes cortico-striatales alors que cette tendance est inversée dans le groupe isoflurane (4 atteintes striatales pour 2 atteintes cortico-striatales).

4.4.2.2. Facteurs correctifs appliqués pour le calcul des aires des ROI.

Les facteurs correctifs (rapport de l'aire de l'hémisphère contro et de l'aire de l'hémisphère ipsi) appliqués aux aires hypodébit, œdème et mismatch sont $0,98 \pm 0,06$ (groupe isoflurane), $0,98 \pm 0,05$ (groupe sévoflurane), $0,96 \pm 0,08$ (groupe propofol) et $0,95 \pm 0,06$ (groupe thiopental). Aucune différence significative entre anesthésiques n'est observée.

4.4.2.3. Quantification des VOI.

La figure 4.11 et le tableau 4.6 montrent les volumes d'intérêt hémisphère ipsi, contro, œdème (corrigé), mismatch (corrigé) et hypodébit (corrigé) pour chaque anesthésique.

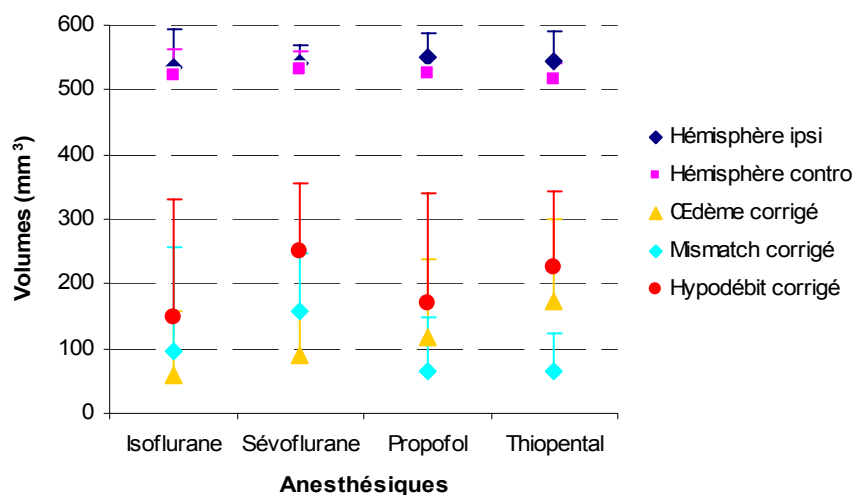


Figure 4.11 : VOI (mm³) pour chaque anesthésique. Moyenne ± ET.

	Isoflurane	Sévoflurane	Propofol	Thiopental
Hémisphère contro	523 ± 41	533 ± 26	527 ± 23	517 ± 25
Hémisphère ipsi	536 ± 58	543 ± 28	551 ± 36	544 ± 46
Œdème corrigé	58 ± 99	89 ± 68	118 ± 121	172 ± 129
Mismatch corrigé	96 ± 161	159 ± 90	66 ± 83	64 ± 58
Hypodébit corrigé	150 ± 181	251 ± 105	170 ± 172	227 ± 116

Tableau 4.6 : VOI (mm³) pour chaque anesthésique. Moyenne ± ET.

Le thiopental est l'anesthésique pour lequel le volume d'œdème est le plus élevé (172 ± 129 mm³) tandis que le volume de mismatch est le plus faible avec celui du propofol (64 ± 58 et 66 ± 83 mm³ respectivement).

Les volumes d'œdème et d'hypodébit sont les plus faibles (58 ± 99 et 150 ± 91 mm³ respectivement) sous isoflurane.

Sous sévoflurane, les volumes d'hypodébit et de mismatch sont les plus élevés (251 ± 105 et 159 ± 90 mm³ respectivement) alors que le volume d'œdème est faible (89 ± 68 mm³).

Statistiquement, aucune différence significative entre groupes n'est observée quel que soit le VOI considéré. Le choix de l'anesthésique n'a pas d'influence sur la taille des VOI obtenus.

4.4.3. Données ¹⁴C-iodoantipyrine.

4.4.3.1. DSC moyen dans les différents VOI.

La figure 4.12 montre la coupe autoradiographique située à bregma -2,3 mm pour chaque rat.

La figure 4.13 montre le DSC moyen mesuré dans les VOI hémisphère contro et hémisphère ipsi pour chaque anesthésique. Les groupes isoflurane et sévoflurane présentent des DSC semblables dans l'hémisphère contro (135 ± 63 et 137 ± 43 ml/100g/min respectivement). Sous propofol, le DSC dans l'hémisphère contro (195 ± 128 ml/100g/min) est statistiquement plus élevé que sous les autres anesthésiques tandis que le thiopental induit un DSC plus faible (86 ± 33 ml/100g/min) et statistiquement différent des autres molécules.

L'occlusion de l'ACM entraîne, comme attendu, une baisse du DSC de l'hémisphère ipsi comparé à l'hémisphère contro quel que soit l'anesthésique. La baisse de DSC la plus importante est observée pour le propofol (chute de 45 % de la valeur de l'hémisphère contro) et la plus faible pour l'isoflurane (chute de 26 % de la valeur de l'hémisphère contro). Les valeurs de DSC dans l'hémisphère ipsilatéral pour les groupes isoflurane, propofol et sévoflurane sont semblables et statistiquement plus élevées que les valeurs sous thiopental.

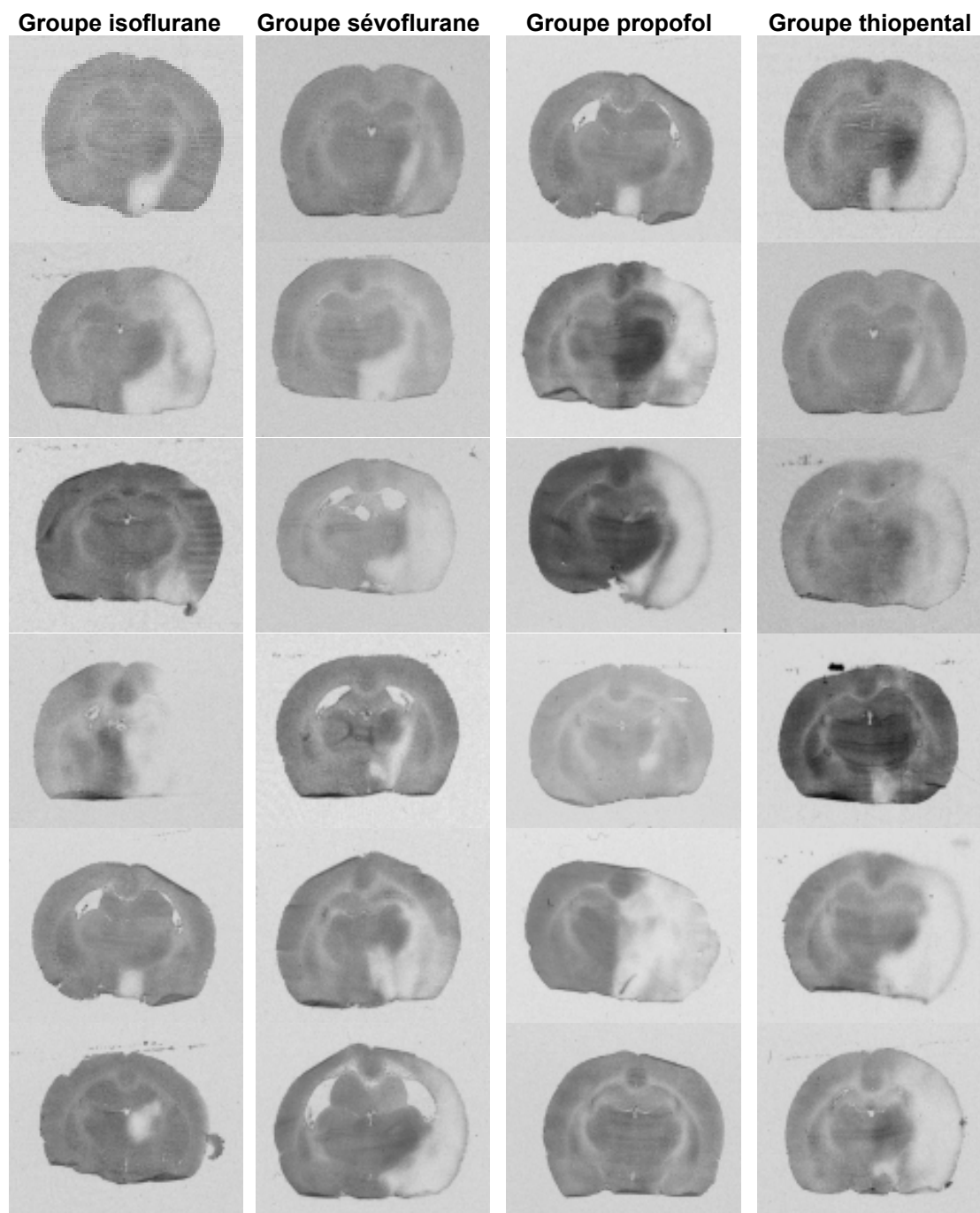


Figure 4.12 : Coupe autoradiographique située à bregma -2.3 mm pour les 24 rats, groupés par anesthésique.

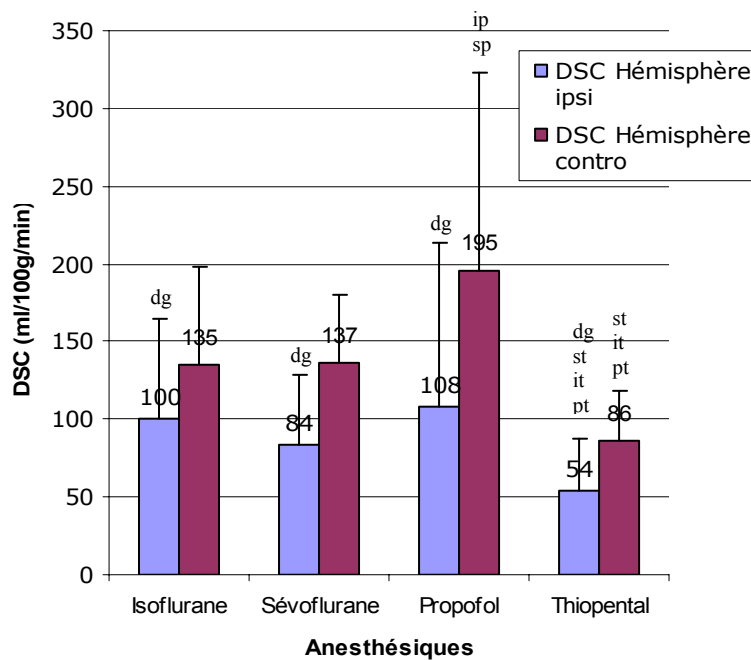


Figure 4.13 : DSC moyen dans les VOI hémisphère ipsi et contro pour chaque anesthésique. Moyenne \pm ET. is: isoflurane vs sévoflurane ; ip: isoflurane vs propofol ; it: isoflurane vs thiopental ; sévoflurane vs propofol ; st: sévoflurane vs thiopental ; pt: propofol vs thiopental ; dg : hémisphère ipsi vs hémisphère contro.

La figure 4.14 montre le DSC moyen mesuré dans les VOI œdème, mismatch et hypodébit pour chaque anesthésique.

Dans les groupes sévoflurane, isoflurane et propofol, les DSC dans l'œdème sont statistiquement semblables. Le DSC dans l'œdème sous thiopental (16 ± 14 ml/100g/min) est statistiquement plus faible que celui sous propofol ou sévoflurane.

Dans le mismatch, une différence significative est observée entre le DSC le plus élevé observé dans le groupe propofol (73 ± 65 ml/100g/min) et le moins élevé pour le groupe thiopental (38 ± 22 ml/100g/min). Dans les groupes isoflurane et sévoflurane, les DSC sont équivalents et statistiquement plus élevés que dans le groupe thiopental.

En ce qui concerne la zone d'hypodébit, les groupes isoflurane et thiopental montrent des DSC semblables et statistiquement plus faibles que ceux des groupes sévoflurane et propofol qui sont identiques.

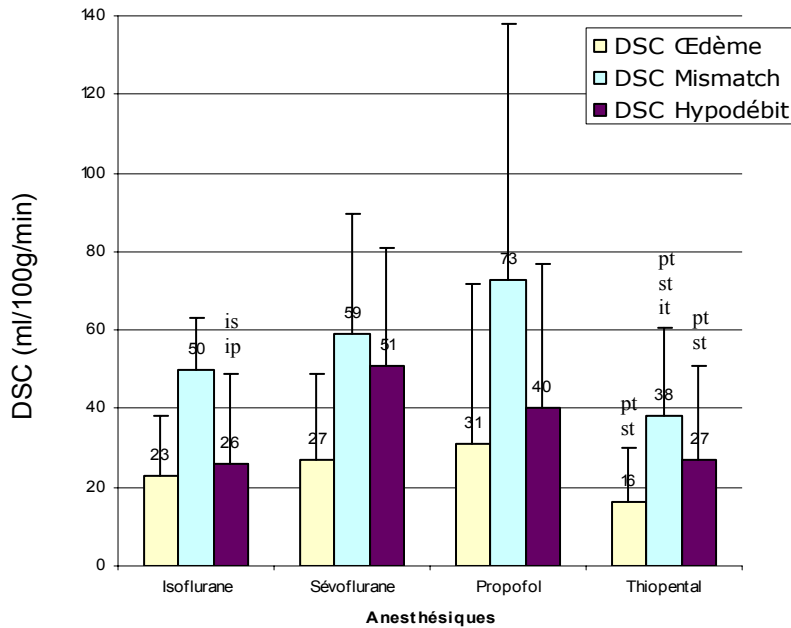


Figure 4.14 : DSC moyen dans les VOI œdème, mismatch et hypodébit pour chaque anesthésique. Moyenne \pm ET. is: isoflurane vs sévoflurane ; ip: isoflurane vs propofol ; it: isoflurane vs thiopental ; sp: sévoflurane vs propofol ; st: sévoflurane vs thiopental ; pt: propofol vs thiopental.

4.4.3.2. Distribution des DSC.

La figure 4.15 montre les volumes tissulaires cumulés pour chaque groupe (exprimés en pourcentage du volume total du VOI considéré) en fonction des DSC répartis par tranches de 10 ml/100g/min dans l'intervalle 0 à 250 ml/100g/min, dans les VOI hémisphère contro, hypodébit et œdème. La limite de 250 ml/100g/min a été choisie pour inclure un maximum de pixels au vu des ET importants observés sur les moyennes des différents VOI.

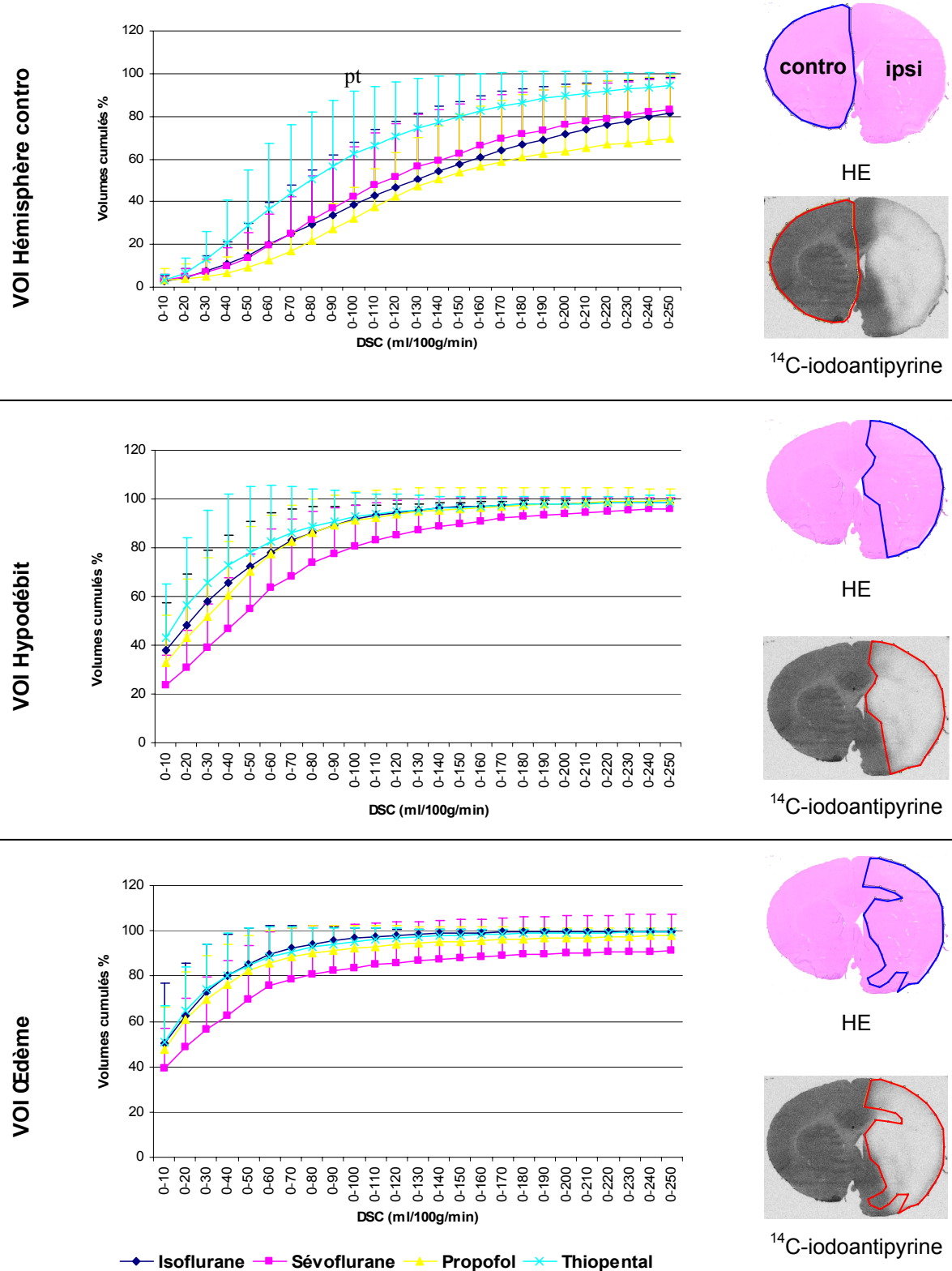


Figure 4.15 : Volumes tissulaires cumulés (exprimés en % du volume total du VOI considéré) en fonction du DSC dans les VOI hémisphère contro, hypodébit et œdème. La barre d'erreur représente un écart-type. pt : propofol vs thiopental. A droite sont représentés les différents VOI sur une coupe histologique HE et autoradiographique.

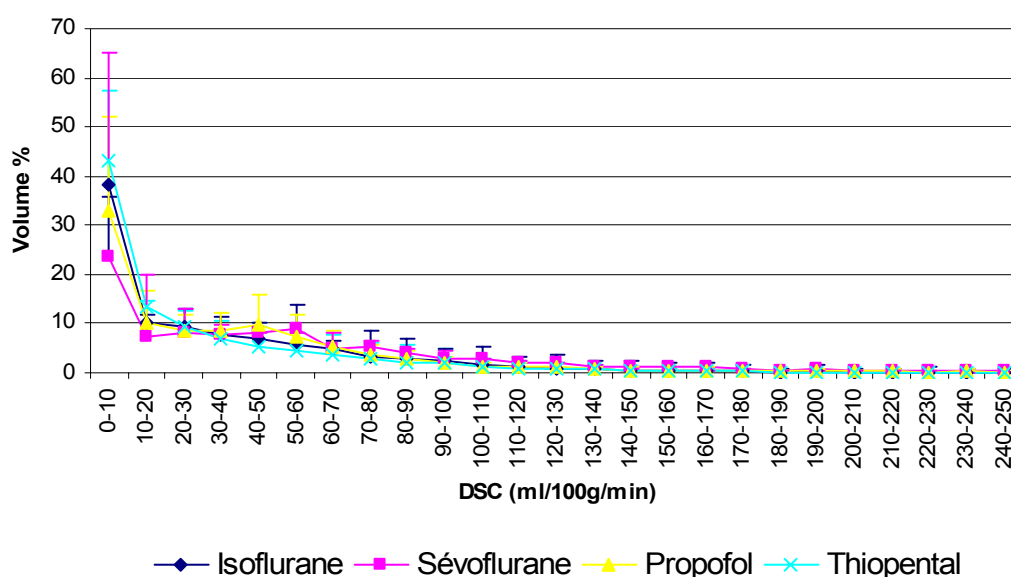


Figure 4.16 : Volumes tissulaires dans le VOI œdème (exprimés en % du volume total du VOI œdème) en fonction du DSC. La barre d'erreur représente un ET.

La figure 4.16 montre les volumes tissulaires dans le VOI œdème (exprimé en % du volume total du VOI œdème) en fonction des classes de DSC non cumulées. L'anesthésie au sévoflurane a tendance à réduire le volume de tissu ayant un DSC compris entre 0 et 20 ml/100g/min au profit des classes de DSC 40 à 90 ml/100g/min, comparé aux autres anesthésiques.

4.5. Discussion.

4.5.1. Paramètres physiologiques.

Pour permettre la comparaison de l'effet des différents anesthésiques sur le DSC et les dommages ischémiques induits à deux heures d'occlusion, il convient de vérifier que les paramètres physiologiques susceptibles d'interférer avec les mesures effectuées dans cette étude sont comparables entre les groupes. En effet, il a été montré à plusieurs reprises que les paramètres tels que la PAM, le pH et les gaz du sang déterminent de façon critique le développement de l'ischémie cérébrale²³³ et notamment la taille finale de l'infarctus³⁹. Dans notre protocole expérimental, un effort méthodologique a été réalisé pour essayer d'uniformiser au maximum les conditions expérimentales entre groupes. Les limites physiologiques que nous nous sommes fixées sont de 30 à 40 mm Hg pour la PaCO₂, de 36,5 à 37,5°C pour la

température cérébrale et corporelle, une PAM > 80 mm Hg, une PaO₂ entre 120 et 200 mm Hg, un pH entre 7,35 et 7,45 et une hémoglobine > 11 g/dl. Outre l'équité des doses d'anesthésiques déjà discutée auparavant, les animaux ont été trachéotomisés et ventilés artificiellement dans le but de pouvoir agir sur les paramètres ventilatoires (fréquence et volume) pour mieux contrôler les gaz du sang. En effet, il a été montré qu'une hypocapnie induite au cours de l'ischémie cérébrale augmentait la taille de la zone de tissu à risque d'infarctus ayant un DSC compris entre 6 et 23 ml/100g/min, par comparaison à une situation normocapnique¹⁸⁰. De même, des conditions hypercapniques induites au cours d'un modèle d'ischémie cérébrale focale chez le chat augmente le volume d'infarctus d'environ 30% par rapport aux conditions normocapniques³¹. Dans notre étude, les moyennes de PaCO₂ sur la durée de l'expérience se situent entre 30 et 40 mm Hg pour chacun des groupes, attestant que des conditions physiologiques ont été maintenues durant toute la période d'occlusion. En conséquence, on peut considérer que l'homogénéité des groupes concernant ce paramètre est acceptable pour la comparaison de l'effet des différents anesthésiques.

Les valeurs de PaO₂ indiquent que le niveau d'O₂ était suffisant pour tous les rats. La valeur de PaO₂ est significativement plus élevée dans le groupe sévoflurane que dans les autres groupes. Cependant, ces différences dans l'oxygénation du sang ne sont pas physiologiquement significatives.

L'acidose cérébrale résultant de l'augmentation de la PaCO₂ tissulaire ou de l'accumulation d'acides produits par le métabolisme est également connue comme contribuant aux dommages ischémiques. Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* analysant le rôle de l'acidose au cours de l'ischémie ont démontré une augmentation des dommages ischémiques associés à la chute du pH intra et extracellulaire^{53, 110}. Dans ces études où l'acidose est la conséquence de la production anaérobie d'acide lactique ou de l'induction d'une hypercapnie >300 mm Hg, le pH est abaissé à des valeurs de 6,5 à 6,7 voire 6,0 si l'ischémie est précédée d'une hyperglycémie ou est incomplète²³⁰. Le pH physiologique étant de 7,42 chez le rat, les valeurs mesurées pendant les deux heures d'occlusion de notre étude (de 7,38 à 7,45) restent dans des limites physiologiques acceptables et sans commune mesure avec celles des études citées précédemment.

Concernant la PAM, il a été montré que l'induction d'une hypertension artérielle pendant la période ischémique et à la reperfusion diminuaient les dommages cérébraux et l'œdème^{39,95,201}. Durant une ischémie cérébrale sévère, l'autorégulation du DSC est rapidement dépassée en même temps que la vasodilatation artériolaire maximale est atteinte. Dans ce cas, le DSC collatéral arrivant aux régions ischémiques peut être augmenté si la pression de perfusion cérébrale augmente. Une augmentation de la PAM peut alors résulter en une vasoconstriction des tissus non-ischémiques et un détournement du flux sanguin au profit des régions

ischémiques où la vasodilatation est déjà maximale. Chez le rat Sprague-Dawley, la PAM se situe aux alentours de 100 à 120 mm Hg à l'état éveillé et de 80 à 100 mm Hg sous anesthésie à l'isoflurane^{39, 87, 215}. Dans notre étude, les PAM varient de 75 à 98 mm Hg selon les groupes et témoignent d'une tendance à l'hypotension pour les groupes isoflurane et sévoflurane en particulier. Ces agents halogénés sont d'ailleurs parfaitement connus pour induire une baisse de la PAM au cours de l'anesthésie²⁶. Des injections répétées de solution saline n'ont pas suffi à corriger la PAM pour ces groupes qui auraient nécessité l'administration d'agents pharmacologiques vasopresseurs tels que l'adrénaline ou la dopamine. Dans ce cas, la comparaison des groupes ayant reçu ce traitement avec les groupes n'en ayant pas nécessité aurait été difficile car l'interférence de ces drogues sur le développement de l'ischémie cérébrale est inconnue. Le choix de ne pas administrer ce type de traitement a donc été fait.

En ce qui concerne la température, de nombreuses données expérimentales et études cliniques montrent que l'hypothermie protège le cerveau des dommages ischémiques¹⁶¹. Dans l'ischémie cérébrale du rongeur, l'hypothermie résulte en une diminution significative de la taille de l'infarctus¹²². Ces études ont montré que l'hypothermie intra-ischémique était plus protectrice que l'hypothermie post-ischémique et que le bénéfice de ce traitement était plus important dans les modèles d'occlusion temporaires par rapport aux permanents. En clinique, quelques études ont montré des résultats encourageants dans l'utilisation de l'hypothermie comme neuroprotecteur mais de sérieux effets secondaires, comme l'hypotension, l'arythmie cardiaque ou la pneumonie, ont également été rapportés¹⁶¹. Dans notre étude, la température rectale et la température cérébrale ont été conjointement mesurées. En effet, DeBow et Colbourne⁴⁹ ont montré que la température mesurée par voie rectale chez le rongeur ne reflétait pas précisément la température cérébrale, qui était souvent inférieure (jusqu'à plusieurs °C) en absence de système de réchauffement local. Par contre, la température du muscle temporal reflète correctement la température intracérébrale de l'animal³². La mesure et la régulation de la température du muscle temporal grâce à un thermocouple relié à une lampe chauffante placée au dessus de la tête de l'animal a permis de maintenir une température cérébrale homogène entre groupes et dans les limites physiologiques que nous nous sommes fixées (sauf pour le groupe isoflurane).

Globalement, les paramètres physiologiques de notre étude sont satisfaisants et suffisamment homogènes pour permettre une comparaison des différents groupes d'anesthésiques.

4.5.2. Données HE.

Pour chaque groupe, le calcul du facteur correctif appliqué aux aires œdème, mismatch et hypodébit témoigne d'une augmentation de volume de l'hémisphère ischémié par rapport à l'hémisphère controlatéral. Bien que statistiquement non significative, cette augmentation de volume varie de 2 à 5% et est parfaitement compatible avec la formation d'un œdème cérébral et de l'augmentation du contenu en eau de l'hémisphère ischémié^{19, 200}. Cette approche minimise ainsi l'erreur introduite par l'œdème, qui déforme et élargit la zone tissulaire lésée après sortie de la boîte crânienne.

Le volume d'œdème observé à 2 heures d'occlusion est le plus faible sous isoflurane. Cet anesthésique a déjà montré des propriétés bénéfiques sur l'ischémie cérébrale focale chez le rat en réduisant la taille de l'infarctus observé à 2 jours de reperfusion après une occlusion de l'ACM de 70 min sous anesthésie, par comparaison à une occlusion réalisée à l'état éveillé¹¹². Cependant, il est également connu que ce bénéfice disparaît à 14 jours post-reperfusion même si la nécrose neuronale sélective semble alors être moins importante pour le groupe anesthésié. L'isoflurane semblerait donc retarder mais non prévenir l'infarctus cérébral chez ces animaux¹¹¹. D'autres études confirment cette capacité de l'isoflurane à réduire le volume de la lésion corticale ischémique pour des doses supprimant les bouffées du tracé électroencéphalographique et suggèrent qu'il agirait en atténuant les phénomènes excitotoxiques^{60, 115}. Dans une étude comparant l'effet de l'isoflurane et du thiopental après une occlusion de l'ACM de 3 heures suivie d'une reperfusion de 2 heures chez le rat, Drummond et coll⁵⁷ ont montré que le volume des dommages cérébraux déterminé par histologie était significativement plus faible pour le thiopental comparé à l'isoflurane. Ces résultats sont en apparence contradiction avec les nôtres puisque le volume des dommages à 2 heures d'occlusion dans notre étude est le plus élevé pour le thiopental et le plus faible pour l'isoflurane. Cependant, le modèle utilisé par Drummond et coll n'est pas identique au nôtre puisqu'il ne comprend pas la même durée d'occlusion, inclue un préconditionnement et une reperfusion. De plus, les animaux utilisés dans son étude sont des rats spontanément hypertendus (SHR) ayant une prédisposition génétique aux lésions cérébrovasculaires et en particulier à l'ischémie cérébrale. Il est aujourd'hui connu que la variabilité des modèles ischémiques est étroitement liée à la souche de l'animal utilisée et qu'il est particulièrement important de considérer ces différences dans l'interprétation des résultats et leur extrapolation à l'homme. Une étude sur l'hypothermie a montré d'importantes disparités du volume lésionnel ischémique entre des rats SHR, Wistar et Long Evans pourtant traités dans les mêmes conditions¹⁷⁵. Une étude de doses d'isoflurane sur la mort neuronale induite après une ischémie

cérébrale globale a révélé que des concentrations d'isoflurane <1,5 MAC induisaient moins de dommages cérébraux que des concentrations supérieures¹⁵⁴. Ces données soulignent la difficulté d'effectuer des comparaisons entre des études pour lesquelles les conditions expérimentales diffèrent.

Peu de données dans la littérature concernent l'influence du sévoflurane sur le développement et l'issue finale d'une ischémie cérébrale. Werner et coll²²⁶ ont montré une amélioration des scores neurologiques à 24 heures chez le rat ayant subi une ischémie cérébrale globale de 30 min sous sévoflurane par comparaison à une anesthésie au fentanyl. Plus récemment, une inhibition complète des dommages neuronaux a été montrée chez le rat au cours d'une ischémie cérébrale globale avec reperfusion sous sévoflurane, comparé au fentanyl¹⁶³. Comme l'isoflurane, le sévoflurane induit une vasodilatation systémique dose-dépendante, déprime la fonction cardiaque et supprime l'activité du système nerveux sympathique. Ces propriétés pharmacologiques intéressantes et la dépression du métabolisme cérébral associée à des changements mineurs du DSC suggèrent que le sévoflurane pourrait être un anesthésique de choix en neurochirurgie¹⁰⁷. Son coût est cependant beaucoup plus élevé que celui de l'isoflurane. Dans notre étude, le sévoflurane est, après l'isoflurane, l'anesthésique qui induit le volume d'œdème le plus faible à 2 heures d'occlusion.

Le propofol montre quant à lui un volume d'œdème plus important que celui observé sous isoflurane ou sévoflurane. Les données de la littérature sur les capacités neuroprotectrices de cet anesthésique sont controversées. Plusieurs études ont démontré des propriétés protectrices dans des modèles animaux d'ischémie cérébrale focale^{5, 76} ou globale⁶² ou *in vivo* sur des préparations cellulaires^{5, 48, 199}. D'autres au contraire ont souligné son incapacité à réduire les déficits neurologiques postopératoires après une chirurgie cardiaque¹⁷⁷ et à protéger les cellules dans des modèles d'ischémie cérébrale *in vitro*²³⁴. Une étude comparant les effets du propofol et du pentobarbital après une ischémie cérébrale focale temporaire chez le rat n'a montré aucune différence entre les deux anesthésiques en terme de volume d'infarctus à 7 jours post-occlusion¹⁷². Dans un modèle d'ischémie globale chez la gerbille, Ito et coll¹⁰⁴ ont démontré que le propofol administré à une dose de 50 mg/kg réduisait les dommages neuronaux de façon significative par rapport à une dose de 25 mg/kg et de façon non significative par rapport à l'isoflurane 1,0%. Comparé au pentobarbital, le propofol est également protecteur des cellules neuronales. Si on considère que l'on peut associer le pentobarbital au thiopental car faisant partie de la même famille des barbituriques, ces données sont en adéquation partielle avec les résultats de notre étude dans laquelle le propofol semble plus bénéfique que le thiopental mais moins que l'isoflurane. En revanche, les temps d'observation des dommages neuronaux ne sont pas comparables (2 heures d'occlusion vs 1 semaine post-reperfusion).

L'efficacité neuroprotectrice des barbituriques dans les modèles d'ischémie cérébrale focale temporaire est confirmée. Chez la gerbille dans un modèle d'ischémie globale, l'efficacité du thiopental par rapport à l'halothane pour réduire le nombre de neurones nécrotiques 7 jours après l'ischémie a été prouvée⁷. Cependant, tous les barbituriques n'ont pas démontré la même capacité pour réduire les dommages ischémiques chez le rat et leur efficacité individuelle à des doses comparables au plan électrophysiologique seraient différentes⁴². Dans notre étude, le thiopental est l'anesthésique qui a montré la moins bonne efficacité à réduire le volume d'œdème observé à 2 heures d'occlusion.

Les volumes d'hypodébit observés dans notre étude apparaissent logiquement plus importants que les volumes d'œdème pour chaque groupe d'anesthésique. Cette différence, représentée par le volume de mismatch, est particulièrement importante pour le groupe sévoflurane, et dans une moindre mesure pour le groupe isoflurane. Les groupes thiopental et propofol présentent des valeurs de mismatch assez faibles parallèlement aux valeurs d'œdème les plus élevées. Chez l'homme et dans les premières heures d'évolution de l'ischémie cérébrale, il est admis que les régions montrant un déficit de perfusion à l'IRM sont typiquement plus étendues que les lésions observées en imagerie de diffusion. Il a été postulé que cette région de mismatch reflétait la pénombre ischémique, c'est-à-dire le tissu à risque non fonctionnel mais potentiellement viable entourant le cœur ischémique endommagé irréversiblement¹⁵⁸. Sans traitement pharmacologique, la pénombre est partiellement recrutée par le cœur ischémique dans les premières heures après le début des symptômes et contribue finalement en partie à l'infarctus final³³. Ce mismatch fait donc actuellement l'objet de beaucoup d'intérêt car son identification chez les patients pourrait constituer une indication du traitement par thrombolyse en postulant que ces patients montreraient une réduction de l'expansion de leurs lésions. Dans notre étude, l'état de perfusion du tissu cérébral est précisément accessible sur les cartes autoradiographiques. De son côté, l'histologie par coloration HE a permis de mettre en évidence les lésions œdémateuses à 2 heures d'occlusion. Si on fait l'hypothèse, comme nous l'avons auparavant montré dans le chapitre III, que les lésions observées en HE et celles observées en imagerie de diffusion correspondent, on peut penser que la région de mismatch définie dans notre étude fournit une information équivalente à celle définie en IRM pour identifier la pénombre ischémique. Dans ce cas, le sévoflurane et l'isoflurane, montrant les mismatches les plus importants et les volumes d'œdème les plus faibles, seraient potentiellement plus efficaces que le propofol et le thiopental pour limiter l'évolution des dommages ischémiques. L'administration de ces anesthésiques à des patients hors délais d'administration du rt-PA ou à des patients chez qui la thrombolyse est contre-

indiquée pourrait s'avérer bénéfique pour minimiser l'évolution des lésions ischémiques.

4.5.3. Données ¹⁴C-iodoantipyrine.

Le tableau 4.7 indique des valeurs de DSC chez le rat, issues de la littérature, pour les quatre anesthésiques étudiés. Dans notre étude, les valeurs moyennes dans l'hémisphère contro non ischémié sont de 135 ± 63, 137 ± 43, 195 ± 128 et 86 ± 33 ml/100g/min pour l'isoflurane, le sévoflurane, le propofol et le thiopental respectivement (figure 4.13).

Anesthésique ou éveil	DSC (ml/100g/min)	Méthode	Localisation	Référence
Etat éveillé	146	Autoradiographie	Cortex	Vaucher et coll ²¹⁷
	93		Hémisphère	Lenz et coll ¹²⁸
Isoflurane 1 MAC (1,4 %)	160	Autoradiographie	Striatum	Mackensen et coll ¹³⁹
	170		Cortex	
	119		Hémisphère	Lenz et coll ¹²⁸
Isoflurane 1,3 MAC (1,8 %)	135	Autoradiographie	Hémisphère	Notre étude
Isoflurane 1,5 MAC (2,0 %)	230	Autoradiographie	Hémisphère	Maekawa et coll ¹⁴²
	147		Hémisphère	Hansen et coll ⁸⁵
Isoflurane 2 MAC (2,7 %)	149	Autoradiographie	Hémisphère	Lenz et coll ¹²⁸
	272		Hémisphère	Maekawa et coll ¹⁴²
Sévoflurane 1 MAC	104	Autoradiographie	Hémisphère	
Sévoflurane 1,3 MAC (2,6 %)	137	Autoradiographie	Hémisphère	Notre étude
Sévoflurane 2 MAC	118	Autoradiographie	Hémisphère	Lenz et coll ¹²⁸
Propofol 10 mg/kg bolus IV puis infusion 30 mg/kg/h	160	Autoradiographie	Cortex	Bhardwaj et coll ²⁷
Propofol 75 mg/kg IP puis infusion 100 mg/kg/h IV	195	Autoradiographie	Hémisphère	Notre étude
Thiopental 40 mg/kg IP	105	Spectroscopie RMN du ¹⁹ F	Cortex	Rudin et coll ¹⁷⁹
Thiopental 40 mg/kg IP puis infusion 60 mg/kg/h IP	86	Autoradiographie	Hémisphère	Notre étude

Tableau 4.7 : Valeurs de DSC en noir, chez le rat sain éveillé et sous différents anesthésiques, issues de la littérature. Les valeurs de DSC de l'hémisphère contro de notre étude sont indiquées en rouge.

Par comparaison à celles de la littérature, ces valeurs suivent une même tendance puisqu'elles montrent des DSC plutôt élevés pour l'isoflurane et le propofol et plutôt

faibles pour le thiopental. Seul le sévoflurane montre une valeur de DSC plus élevée dans notre étude que celle de la littérature. Cependant, dans l'étude de Lenz et coll¹²⁸, le DSC de base chez le rat éveillé est déjà plus faible que celui couramment admis et que celui de l'étude de Vaucher et coll²¹⁷, même si les paramètres physiologiques dans ces deux études sont comparables.

Les DSC moyens dans la zone d'œdème varient entre 16 et 31 ml/100g/min selon l'anesthésique (figure 4.14). Considérant que le DSC en dessous duquel le tissu est à fort risque d'infarctus est d'environ 25 ml/100g/min chez le rat¹¹, ces valeurs de DSC sont compatibles avec l'idée que les zones d'œdème pourraient être prédictives du cœur de l'infarctus. De la même façon, les valeurs de DSC dans les zones de mismatch pour l'isoflurane et le thiopental sont en adéquation avec le seuil de pénombre ischémique définie chez le rat comme étant environ de 50 ml/100g/min. Pour ces deux anesthésiques, la zone de mismatch observée sur les images autoradiographiques pourrait ainsi représenter la zone de tissu potentiellement viable. Les zones de mismatch des groupes sévoflurane et propofol montrent des valeurs de DSC plus élevées que pour les groupes isoflurane et thiopental, suggérant que le volume de la zone de pénombre potentiellement à risque est réduit par rapport au volume de la zone de mismatch et qu'il existe une zone de transition entre la pénombre et le tissu sain où des DSC plus élevés sont maintenus.

La figure 4.15 renseigne sur la distribution des DSC à l'intérieur des VOI hémisphère contro, hypodébit et œdème. Concernant l'hémisphère contro, la somme des volumes cumulés n'atteint pas 100% quel que soit l'anesthésique considéré. Ce résultat s'explique par le fait que les DSC supérieures à 250 ml/100g/min n'ont pas été pris en compte dans ce graphique. Or, étant donné les moyennes \pm ET des DSC observés dans l'hémisphère contro, il n'est pas aberrant de penser qu'un important volume de l'hémisphère contro puisse montrer des valeurs de DSC supérieures à 250 ml/100g/min. Pour l'isoflurane, une étude de Maekawa et coll¹⁴² a montré des valeurs de DSC très élevées dans certaines structures cérébrales (colliculus supérieur et inférieur, geniculate médian et latéral) sous 1,5 à 2,0 MAC d'isoflurane comparé à l'état éveillé. Pour le propofol, ce résultat paraît surprenant au vue des données de la littérature indiquant qu'il diminue le DSC²⁷. L'analyse individuelle des animaux de ce groupe a montré que deux rats sur les six avaient des DSC dans l'hémisphère gauche particulièrement élevés puisqu'allant jusqu'à 400 ml/100g/min. Les quatre autres rats avaient des DSC entre 101 et 131 ml/100g/min. La possibilité d'erreurs liées à une épaisseur de coupe trop importante ou à l'état hypercapnique des animaux au moment de la mesure a été écartée et aucune explication à ces hauts débits n'est donnée à ce stade. Seul le thiopental montre des volumes cumulés proches de 100%, ce qui est en adéquation avec la faible moyenne des

DSC sur l'hémisphère gauche (86 ± 33 ml/100g/min) et les données de la littérature qui soulignent que cet anesthésique réduit d'environ 30% le DSC et le métabolisme cérébral¹³⁵.

Dans les VOI hypodébit et œdème, le sévoflurane se démarque des autres anesthésiques en y maintenant des DSC plus élevés et en y réduisant en particulier la proportion de tissu ayant des très bas DSC < 20 ml/100g/min. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le maintien de DSC plus élevés pour le groupe sévoflurane par rapport au groupe isoflurane : (1) le sévoflurane, comme l'isoflurane et les autres anesthésiques halogénés, produit une augmentation dose-dépendante du DSC¹⁴⁸. Parallèlement, les halogénés diminuent la consommation cérébrale en oxygène (CMRO₂) et abaissent ainsi le DSC par effet vasoconstricteur indirect modulé par le couplage DSC / CMRO₂⁹⁰. L'effet résultant sur le DSC est donc dépendant de l'équilibre entre les propriétés vasodilatatrices intrinsèques de l'agent et de la vasoconstriction secondaire au couplage agissant en sens contraire. Dans des conditions d'ischémie cérébrale sévère, la CMRO₂ est très diminuée et les agents halogénés n'ont alors qu'un effet vasodilatateur. Un effet vasodilatateur du sévoflurane supérieur à celui de l'isoflurane permettrait ainsi d'expliquer ces résultats. Cependant, les données de la littérature n'accréditent pas cette hypothèse puisque plusieurs études ont montré que les capacités intrinsèques vasodilatatrices du sévoflurane étaient moindres que celles de l'isoflurane^{22, 148}. (2) Bien que la CMRO₂ n'ait pas été mesurée dans cette étude, l'hypothèse d'un découplage DSC / CMRO₂ ou plus simplement d'une modification du rapport de couplage pourrait expliquer cette perfusion de luxe associée au sévoflurane. Une telle situation où le DSC serait maintenu à des valeurs supérieures à celles attendues en rapport à la réduction de la CMRO₂ a été récemment suggérée par Heath et coll⁹⁰ qui a montré qu'une importante dose de sévoflurane chez l'homme (1,5 MAC) ne modifiait pas le DSC tout en réduisant la CMRO₂ de 25%, contrairement à une dose de 0,5 MAC qui ne modifiait aucun de ces deux paramètres. Cette augmentation du rapport DSC / CMRO₂ pourrait donc induire une perfusion de luxe particulièrement bénéfique dans les zones où le DSC atteint des valeurs critiques pour la survie cellulaire. Le sévoflurane aurait en ce sens des propriétés favorables à son utilisation en anesthésie neurochirurgicale.

4.5.4. Conclusions.

Au-delà de l'évaluation de l'effet thérapeutique des anesthésiques sur le développement de l'ischémie cérébrale, cette étude souligne en premier lieu l'influence des conditions expérimentales et leur importance dans l'interprétation des

données issues de ce modèle animal. Les résultats décrits dans ce chapitre indiquent clairement que le DSC pendant la phase d'occlusion est différent selon l'anesthésique considéré et que les volumes d'œdème observés à deux heures d'occlusion de l'ACM montrent des disparités importantes malgré leur manque de significativité statistique. L'anesthésie générale de l'animal est nécessaire dans ce type de modèle chirurgicalement invasif mais pourra potentiellement conduire à des biais dans l'interprétation de résultats quand il s'agira par exemple de comparer l'effet pharmacologique de médicaments dans des conditions expérimentales différentes. L'inefficacité récurrente de traitements apparemment neuroprotecteurs dans de nombreuses études cliniques pourrait partiellement être expliquée par les conclusions trop optimistes issues d'études précliniques aux considérations méthodologiques insuffisantes²⁴⁰. Le deuxième point souligné par cette étude est l'insuffisante reproductibilité du modèle d'occlusion de l'ACM. En effet, au sein d'un même groupe d'anesthésique, l'écart-type observé sur la moyenne des volumes d'œdème à deux heures d'occlusion est souvent très élevé et témoigne de l'hétérogénéité de l'étendue des lésions induites. Un meilleur contrôle du niveau d'occlusion de l'ACM semble nécessaire pour permettre la constitution de groupes d'animaux plus homogènes. Ce contrôle pourra possiblement être réalisé grâce à la mise en œuvre de mesures de DSC par vélocimétrie Laser-Doppler.

Concernant l'effet pharmacologique des anesthésiques sur l'ischémie cérébrale, l'étude menée dans ce chapitre n'a pas eu pour objectif de rechercher un rôle neuroprotecteur de ces agents. Nous n'avons aucune indication sur la taille de l'infarctus final induit à plusieurs jours par ce modèle, le volume d'œdème observé à deux heures d'occlusion étant susceptible d'évoluer avec le temps. Cependant, au vu de nos résultats, deux constatations intéressantes peuvent être formulées : (1) l'isoflurane et le sévoflurane entraînent des volumes d'œdèmes moins importants et des volumes de mismatch plus importants que le propofol et le thiopental. Cette configuration semble favorable dans l'hypothèse où la zone de mismatch représente la pénombre ischémique potentiellement récupérable après reperfusion. L'anesthésique qui confère le plus petit volume de tissu à très bas DSC et le plus important volume de tissu où les DSC sont maintenus à des niveaux viables pour les cellules semble le plus apte à réduire les dommages ischémiques finaux. (2) Entre l'isoflurane et le sévoflurane, ce dernier induit le volume de mismatch le plus important et préserve des DSC supérieurs dans la zone d'hypodébit, ce qui lui confère un possible avantage dans la préservation de conditions tissulaires viables. A ce stade des observations, le sévoflurane semble être l'anesthésique qui réunit le plus de conditions favorables à une minimisation des dommages ischémiques induits par l'occlusion de l'ACM. Ce bénéfice semble être lié à la préservation d'un DSC intra-ischémique plus élevé par rapport aux autres anesthésiques. Des expériences complémentaires pour valider ou invalider cette hypothèse seront nécessaires. Elles

consisteront notamment à évaluer l'effet des anesthésiques au cours de la reperfusion, à des temps précoces et tardifs, en mesurant le DSC et les lésions induites indicatives de l'issue neurologique finale de l'ischémie. Ces expérimentations permettront de mieux évaluer l'action des anesthésiques et leur bénéfice potentiel absolu ainsi que leurs effets sur le DSC au cours de l'ischémie cérébrale focale transitoire.

Chapitre 5 : Exploration non-invasive par spectrométrie proche-infrarouge des fluctuations hémodynamiques induites au cours de l'ischémie cérébrale focale transitoire chez le rat.

5.1. Introduction.

Ce travail a été effectué en collaboration avec le Laboratoire de Spectrométrie Physique de Grenoble et a constitué une partie de la thèse de physique de Raphaël Sablong¹⁸², soutenue en décembre 2002 sous la direction de Jacques Derouard. Il a consisté à mettre au point un spectromètre d'absorption dans le proche-infrarouge et à en exploiter les possibilités pour l'exploration de l'hémodynamique cérébrale. Les bases théoriques de physique nécessaires à l'analyse et au traitement du signal ainsi que le montage optique de l'appareillage ne seront pas abordés dans ce chapitre, et ont été décrits en détail dans la thèse de Raphaël Sablong¹⁸². La collaboration entre nos deux laboratoires a permis de tester ce spectromètre chez l'animal *in vivo* en situation physiologique et pathologique dans le cadre de l'ischémie cérébrale. Les résultats préliminaires de ces expérimentations, illustrés par des figures extraites de la thèse de Raphaël Sablong¹⁸², sont décrits et commentés dans ce chapitre. Une partie des études préliminaires à ces expériences a fait l'objet d'une publication à la Société Internationale pour l'Ingénierie Optique, présentée en annexe : Sablong R, Grillon E, Hugon O, Derouard J (2001) Non invasive optical monitoring of rat brain and effects of the injection of tracers for blood flow measurements. *Proceedings of SPIE* 4432: 236-241.

5.2. Principe de la spectroscopie proche-infrarouge (NIRS :Near InfraRed Spectroscopy).

La lumière passant à travers une solution colorée (ou chromophore) est absorbée par le composé et l'intensité de la lumière émergente est alors réduite. La relation entre la concentration du chromophore c , son coefficient d'extinction α (qui décrit les caractéristiques optiques du composé à une longueur d'onde donnée), l'épaisseur de la solution d et le rapport de l'intensité de la lumière incidente sur l'intensité de la lumière émergente I_0/I est donné par l'équation de Beer-Lambert :

$$\log (I_0/I) = \alpha c d$$

Quand une lumière d'une longueur d'onde connue traverse une solution contenant un composé de concentration inconnue, le coefficient d'extinction et l'épaisseur de la solution traversée peuvent être substitués dans l'équation de Beer-Lambert pour en déduire la concentration de la substance¹⁶². Ce principe de base des dosages spectrophotométriques colorimétriques utilisés depuis bien des années peut dans

certaines conditions être appliqué aux milieux absorbants et diffusants que sont les milieux biologiques ²²¹. La lumière visible (450 à 700 nm) ne pénètre pas les tissus biologiques au-delà de quelques millimètres de profondeur parce qu'elle est fortement atténuée par l'absorption et la diffusion des constituants tissulaires, en particulier de l'eau. Au contraire, dans la fenêtre des longueurs d'onde du proche infrarouge (700 à 900 nm), les photons sont capables de pénétrer le tissu suffisamment loin pour illuminer des structures profondes comme le cortex cérébral. Les métalloprotéines que sont l'hémoglobine et les cytochromes oxydases se comportent alors comme des chromophores et absorbent les radiations proche-infrarouge de manière différente selon leur concentration et leur interaction avec l'oxygène. Les concentrations de ces composants changent rapidement au cours des altérations de la perfusion et de l'oxygénation cérébrale. Dans ces conditions, les variations de niveaux de lumière détectée indiquent des changements de concentrations des chromophores présents dans les tissus et fournissent des indications en temps réel sur l'hémodynamique et l'oxygénation cérébrale ¹⁴¹. L'idée d'utiliser la lumière pour le diagnostic médical n'est pas récente. L'utilisation de la NIRS comme outil non-invasif pour suivre l'oxygénation cérébrale a été pour la première fois décrite par Jöbsis en 1977 ¹⁰⁵. Des équipements commerciaux sont maintenant disponibles et plusieurs études cliniques ont évalué l'utilisation de la NIRS dans le suivi de patients souffrant d'ischémie cérébrale ¹⁵³, de traumatisme crânien ²²¹, ou chez l'adulte au cours d'interventions chirurgicales cardiaques ²⁰⁷.

Dans le cadre de l'ischémie cérébrale, l'idée de pouvoir suivre de façon simple et répétable la perfusion cérébrale apparaît particulièrement séduisante. Même si différentes techniques permettent déjà la mesure du DSC en clinique (la tomographie par rayons X, la tomographie par émission monophotonique, la tomographie par émission de positons ou l'imagerie par résonance magnétique), elles nécessitent des équipements lourds et un déplacement du malade parfois incompatible avec son état de santé. Elles sont donc incompatibles avec un suivi continu au lit du malade de la perfusion cérébrale qui pourrait pourtant s'avérer très utile au clinicien à la phase aiguë de la maladie ou au cours de l'évaluation d'un traitement thrombolytique. La spectroscopie optique apparaît au contraire comme un outil prometteur par sa capacité à mesurer directement et quantitativement certaines molécules de façon très spécifique et par sa facilité de mise en œuvre au lit même de patients dans un état critique et non transportables.

5.2. Dépistage d'une ischémie cérébrale latéralisée.

La possibilité de mesurer le DSC régional par NIRS de façon non-invasive en suivant la cinétique d'un traceur exogène à travers le crâne a été démontré chez le cochon par Kuebler et coll en 1998¹²³. Les index de débit mesurés par cette technique sont bien corrélés avec les valeurs quantitatives mesurées par la technique de référence des microsphères radioactives. Le but du travail mené au laboratoire a été de détecter un déficit de perfusion chez des rats ayant subi l'occlusion unilatérale d'une artère cérébrale moyenne, par suivi d'un bolus de vert d'indocyanine (ICG, 775 Da) injecté par voie fémorale veineuse. L'ICG est un colorant classique utilisé dans des applications d'optique biomédicale (angiographie rétinienne), de faible toxicité et d'élimination rapide puisque sa demi-vie dans le sang est de l'ordre de trois à quatre minutes chez l'homme et le rat¹²³, ce qui permet des injections rapidement répétées (une injection toutes les 15 minutes environ). Il reste, une fois injecté, strictement confiné dans l'espace intravasculaire (traceur non diffusible) du fait de sa forte affinité pour les protéines plasmatiques auxquelles il se lie complètement (95% à l'albumine, 4,4% aux α -globulines et 0,6% aux β -globulines³⁵). Sa toxicité en cas d'altération de la perméabilité de la BHE n'est cependant pas connue. La solution d'ICG a été préparée dans une solution d'albumine sérique bovine à 1 % pour diminuer son affinité pour le polyéthylène composant les seringues et cathéters intraveineux. L'absorbance moyenne de l'ICG, 200 fois plus forte que celle de l'hémoglobine à 800 nm, a permis la détection du passage du colorant pour de faibles doses bien inférieures à la dose létale¹⁷⁶. Le spectre d'absorption de l'ICG est indiqué figure 5.1.

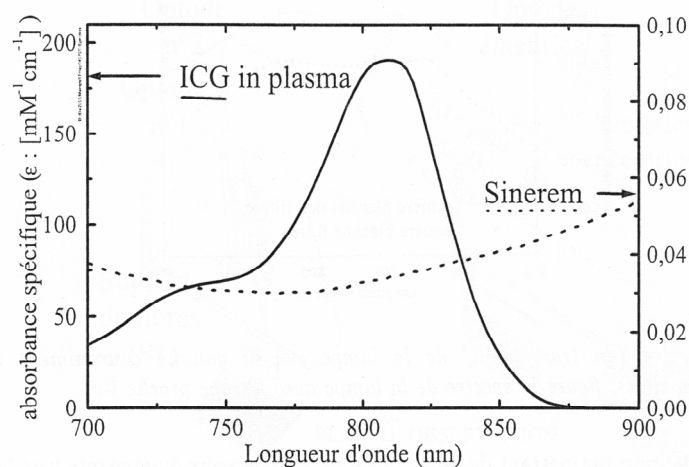


Figure 5.1 : Spectre d'absorption de l'ICG à une concentration de 6,5 $\mu\text{mol/l}$ dans du plasma sanguin.

Préalablement aux expériences sur l'ischémie cérébrale, l'hypothèse selon laquelle la courbe d'intensité lumineuse à 790 nm est représentative des variations de concentration d'ICG, est évaluée. Un suivi simultané des variations temporelles de concentration d'ICG par spectrométrie large bande (source polychromatique, détection par un spectromètre) et laser (source monochromatique laser à 790 nm, détection par photodiodes avec filtre à 790 nm) lors d'une injection IV d'un bolus de 0,2 ml d'ICG à 0,12 g/l chez un rat est effectué (figure 5.2).

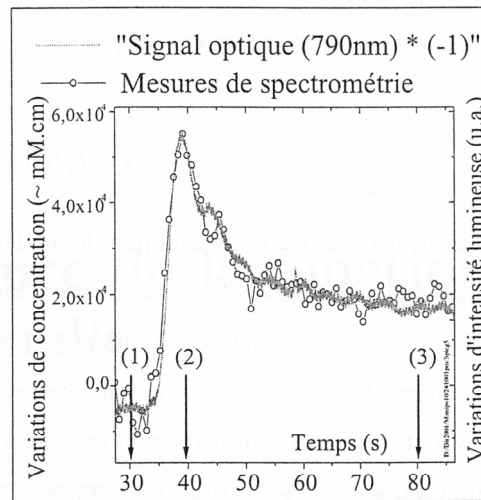


Figure 5.2 : Variations temporelles simultanées des concentrations d'ICG avec source polychromatique ou avec source laser, mesurées grâce à deux couples d'optodes (distance inter-optode = 6 mm).

La figure 5.2 montre que les deux courbes se superposent aisément, ce qui indique que l'utilisation d'une source laser permet une bonne estimation des variations de concentration du colorant. La contribution des autres chromophores (oxyhémoglobine, déoxyhémoglobine) aux variations de l'intensité lumineuse à cette longueur d'onde est négligeable. En dépit de son incapacité à fournir des informations spectrales, la technique à source laser présente l'avantage de caractériser précisément le profil des courbes de bolus grâce à une résolution temporelle adaptée (fréquence d'échantillonnage jusqu'à 250 Hz contre 12 Hz en spectrométrie). Ceci permet une analyse fréquentielle des différentes sources de bruit physiologique (battements cardiaques et mouvements respiratoires) et un filtrage adapté. De plus, une haute résolution temporelle a été nécessaire pour la réalisation des expériences d'imagerie décrites au paragraphe 5.3.

Les expérimentations sur l'ischémie cérébrale ont été menées chez six rats mâles (rats n°1 à 6) de souche Sprague Dawley, anesthésiés par injection IP de chloral hydrate 4%

(1 ml/100 g de poids), trachéotomisés et ventilés artificiellement grâce à un respirateur (CWE Inc, Ardmore, USA). Leur température a été maintenue à $37 \pm 0,5$ °C tout au long du protocole grâce à une couverture chauffante (Panlab LSI Letica, Bioseb, France). Un cathéter a été inséré dans une veine fémorale pour permettre les injections du traceur. L'injection de 0,2 ml de solution d'ICG à 1,2 g/l a été effectuée manuellement en 0,5 seconde environ et avec une reproductibilité sujette à l'opérateur. Trois fibres optiques (optodes) en verre de 600 μm de diamètre ont été positionnées perpendiculairement à la surface du crâne rasé de l'animal de façon non-invasive, grâce à un support qui les maintient solidaires entre elles. L'optode émettrice a été placée sur l'axe du sinus veineux tandis que les optodes réceptrices ont été disposées symétriquement, chacune sur un hémisphère dans le territoire de l'ACM et à une distance d'environ 8 mm de l'optode émettrice. Dans cette configuration où la source et les détecteurs sont dans le même plan, le parcours des photons à travers le milieu biologique prend la forme d'une « banane » dont les extrémités touchent la source et le détecteur et dont la portion médiane pénètre plus profondément dans les tissus (figure 5.3). La distance du centre de la banane au plan contenant le point émetteur et le point récepteur (d sur la figure 5.3) est égale à la distance entre les optodes $1/\sqrt{8}$. Ainsi, plus les optodes sont éloignées, plus la zone de tissu explorée se situe en profondeur.

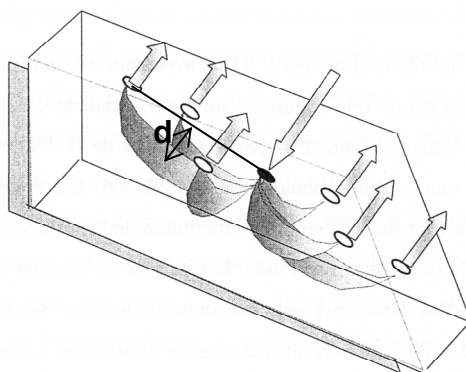


Figure 5.3 : Configuration de mesure comprenant une optode émettrice et six optodes réceptrices permettant l'exploration de six zones en forme de « banane ».

La zone de mesure a été protégée de la lumière environnante par une plaque de mousse noire et un voile de photographe a recouvert la tête de l'animal. L'intensité lumineuse rétrodiffusée à 790 nm (maximum d'absorption de l'ICG) lors du premier passage du bolus d'ICG injecté par vois fémorale a été enregistrée dans trois situations : avant occlusion de l'ACM, après occlusion de l'ACM et après la reperfusion de l'ACM chez le même animal (soit trois injections d'ICG chez le même animal). L'occlusion de l'ACM a été effectuée selon le protocole décrit au chapitre 2. Les fibres

optiques ont été repositionnées entre la situation avant occlusion et la situation après occlusion pour permettre la chirurgie de l'animal, mais pas entre la situation après occlusion et la situation après reperfusion. Les figures 5.4 à 5.9 montrent les enregistrements obtenus pour chacun des six animaux, les 3 cadrans correspondant aux 3 phases subies par l'animal (avant l'occlusion, pendant l'occlusion et après la reperfusion). La courbe noire correspond à l'hémisphère ischémié tandis que la courbe grise se rapporte à l'hémisphère sain. La présence ou non d'une ischémie cérébrale a été mise en évidence post-mortem par visualisation des dommages tissulaires sur une coloration à l'HE.

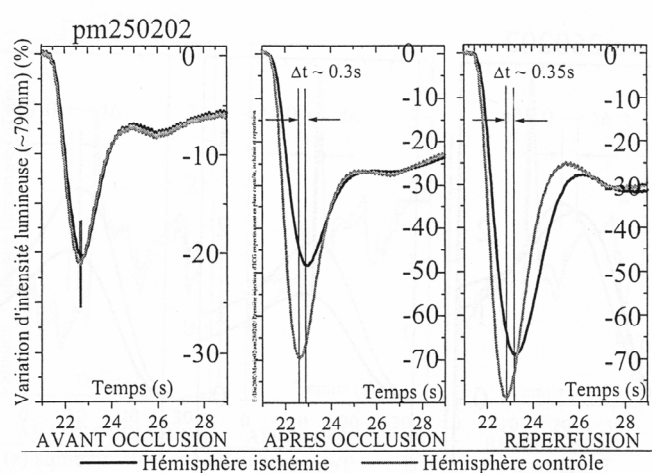


Figure 5.4 : Rat n°1. Suivi de l'intensité rétrodiffusée par l'hémisphère ischémié (en noir) et par l'hémisphère controlatéral (en gris) au passage d'un bolus d'ICG, en situation contrôle (avant occlusion), en situation d'ischémie (après occlusion) et en situation de reperfusion. La fenêtre temporelle a une largeur de 8 secondes. Ischémie confirmée par histologie.

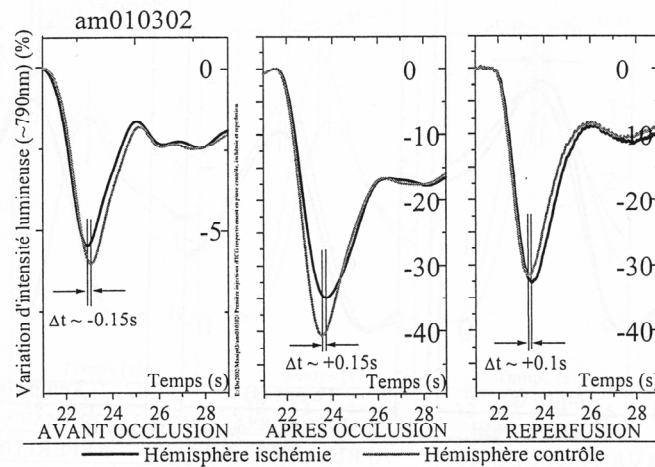


Figure 5.5 : Rat n°2. Suivi de l'intensité rétrodiffusée par l'hémisphère ischémié (en noir) et par l'hémisphère controlatérale (en gris) au passage d'un bolus d'ICG, en situation contrôle (avant occlusion), en situation d'ischémie (après occlusion) et en situation de reperfusion. La fenêtre temporelle a une largeur de 8 secondes. Pas de signe d'ischémie à l'histologie.

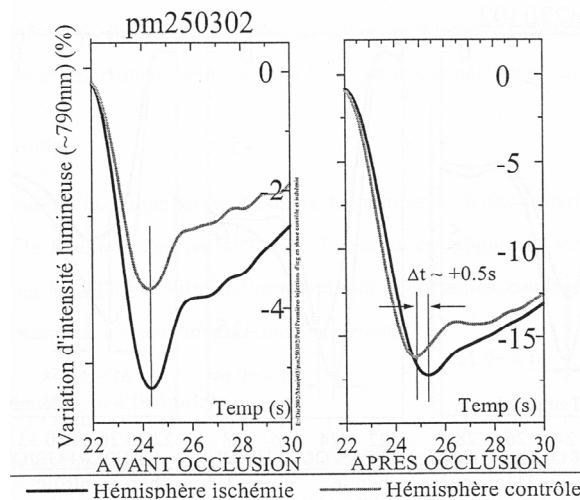


Figure 5.6 : Rat n°3. Suivi de l'intensité rétrodiffusée par l'hémisphère ischémié (en noir) et par l'hémisphère controlatérale (en gris) au passage d'un bolus d'ICG, en situation contrôle (avant occlusion), en situation d'ischémie (après occlusion). La fenêtre temporelle a une largeur de 8 secondes. Hémorragie cérébrale visualisée à l'histologie.

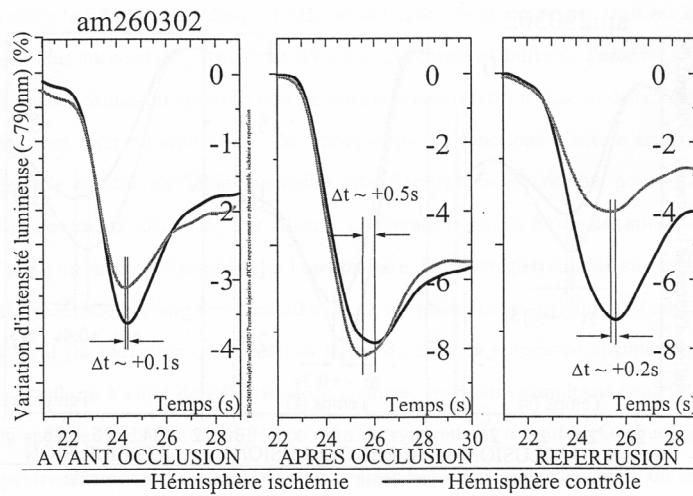


Figure 5.7 : Rat n°4. Suivi de l'intensité rétrodiffusée par l'hémisphère ischémiée (en noir) et par l'hémisphère contrôlée (en gris) au passage d'un bolus d'ICG, en situation contrôlée (avant occlusion), en situation d'ischémie (après occlusion) et en situation de reperfusion. La fenêtre temporelle a une largeur de 8 secondes. Ischémie confirmée par histologie.

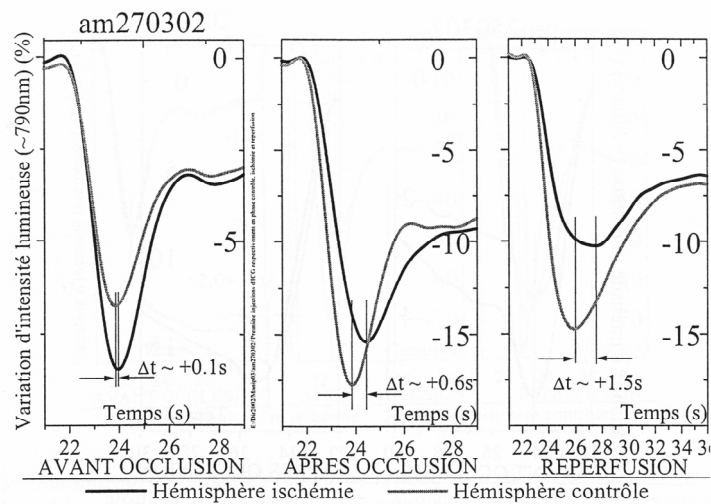


Figure 5.8 : Rat n°5. Suivi de l'intensité rétrodiffusée par l'hémisphère ischémiée (en noir) et par l'hémisphère contrôlée (en gris) au passage d'un bolus d'ICG, en situation contrôlée (avant occlusion), en situation d'ischémie (après occlusion) et en situation de reperfusion. La fenêtre temporelle a une largeur de 8 secondes. Ischémie confirmée par histologie.

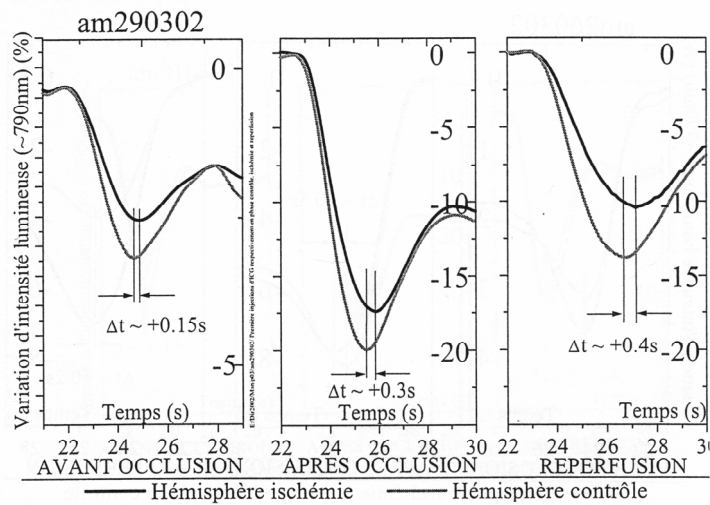


Figure 5.9 : Rat n°6. Suivi de l'intensité rétrodiffusée par l'hémisphère ischémié (en noir) et par l'hémisphère contrôlatérale (en gris) au passage d'un bolus d'ICG, en situation contrôle (avant occlusion), en situation d'ischémie (après occlusion) et en situation de reperfusion. La fenêtre temporelle a une largeur de 8 secondes. Pas de signe d'ischémie à l'histologie.

L'exploitation de ces données a permis d'en extraire un paramètre d'intérêt dans le dépistage de l'ischémie cérébrale : le temps d'arrivée du bolus de colorant, définit comme l'instant de l'extremum de la courbe. Pour les six rats, l'écart de temps d'arrivée inter-hémisphère s'allonge systématiquement entre la situation contrôle (avant occlusion) et la situation d'ischémie (après occlusion). Dans le cas du rat n°5 (figure 5.8), montrant des signes évidents d'ischémie à l'histologie, le bolus arrive dans l'hémisphère ischémié avec un retard d'environ 600 ms par rapport à l'hémisphère sain. Cet écart de temps est à comparer avec la situation contrôle pour lequel il était déjà de 100 ms. Ce décalage des courbes en situation contrôle est observé pour 4 des 6 rats (n° 2, 4, 5 et 6). Il peut refléter une inhomogénéité spatiale de perfusion lié à l'anatomie vasculaire ou une dissymétrie dans le placement des fibres, qui n'explorent alors pas le même territoire intra et extracérébral dans chacun des hémisphères. L'allongement du temps d'arrivée dans l'hémisphère ischémié reflète une modification des flux afférents à la zone ischémiée. Du fait de l'occlusion de l'ACM, les molécules de colorant empruntent des voies collatérales, notamment par l'intermédiaire du polygone de Willis, pour atteindre la zone qui était normalement perfusée par l'ACM. Elles arrivent dans la zone ischémiée avec un retard par rapport aux molécules de colorant circulant dans l'hémisphère sain. En situation de reperfusion, on s'attend à ce que l'écart de temps d'arrivée inter-hémisphère retourne à sa valeur initiale avant occlusion. Cet écart a

seulement tendance à se réduire en situation de reperfusion par rapport à la situation après occlusion pour le rat n° 4 (figure 5.7) ayant des signes d'ischémie. Ce retour incomplet à la situation avant occlusion pourrait s'expliquer par une reperfusion incomplète au temps de la mesure qui est faite immédiatement après le retrait du filament occlusif. A ce moment, la recanalisation de l'ACM est garantie par la vérification de la distance de retrait du filament mais la reperfusion des capillaires du territoire ischémié peut être plus lente voire incomplète en cas de collapsus ou de thrombose des microvaisseaux. Pour 3 animaux (dont 2 ont présenté des signes d'ischémie), l'écart de temps d'arrivée inter-hémisphère augmente après la reperfusion par rapport à la situation après l'occlusion et aucune explication ne peut être avancée pour expliquer ces observations. Le dernier rat (n°3, figure 5.6) est mort avant la reperfusion, probablement d'une hémorragie cérébrale mise en évidence post-mortem. Concernant les amplitudes des courbes, qui reflètent la quantité de colorant arrivant dans la zone explorée, on remarque un affaissement des courbes dans l'hémisphère ischémié durant la phase d'occlusion par rapport à l'hémisphère sain pour les animaux ayant montré des signes d'ischémie (figures 5.4, 5.7 et 5.8). La variation d'intensité lumineuse est plus importante dans l'hémisphère sain par rapport à l'hémisphère ischémié, suggérant que le bolus de colorant arrive de façon moins dispersée dans l'hémisphère sain par rapport à l'hémisphère ischémié car il emprunte un trajet plus direct. Cependant, le rapport des amplitudes en phase contrôle est déjà différent de un et variable selon les animaux. La réduction d'amplitude suite à l'occlusion de l'ACM est alors difficilement interprétable.

Ce dispositif de mesure simultanée de la courbe du bolus d'ICG dans les deux hémisphères a donc permis d'observer un retardement de l'arrivée du bolus dans l'hémisphère ischémié en comparaison à l'hémisphère controlatéral. Cependant, étant donné les fluctuations du temps d'arrivée entre les deux hémisphères déjà observées à l'état initial avant occlusion de l'ACM (avance ou retard), il apparaît que cette mesure est insuffisante pour le diagnostic d'une occlusion artérielle. En effet, l'accroissement du retard est systématique mais n'est interprétable qu'en comparaison à la situation contrôle. Les informations fournies par ces mesures restent assez pauvres (un seul point de mesure, local) mais ont permis de mettre au point et de valider certains aspects méthodologiques de la technique en vue d'expériences d'imagerie.

5.3. Imagerie de perfusion.

Suite aux observations fournies par les expériences décrites dans le paragraphe précédent et pour tenter d'affiner la technique pour le dépistage des AVC, des

expériences d'imagerie ont été réalisées. Elles ont eu pour objectifs d'établir une cartographie du passage d'un bolus d'ICG reflétant l'état de perfusion cérébrale chez un rat ischémié par occlusion de l'ACM. De telles expériences ont déjà été décrites dans la littérature pour l'étude de la réponse hémodynamique à une stimulation fonctionnelle^{136, 137} mais leur résolution temporelle n'a guère dépassé le Hz. De plus, des expériences de suivi de bolus chez l'homme et l'animal n'ont exploré qu'un domaine du cerveau, sondé à plusieurs profondeurs, mais pas plusieurs zones distinctes simultanées. L'imagerie d'un bolus d'ICG comme moyen de cartographier la perfusion cérébrale est donc tout à fait innovante. De plus, la technique a nécessité la mise au point d'un appareillage spécifique de haute résolution temporelle non développé jusqu'alors, constitué de plusieurs couples émetteur / récepteur permettant d'effectuer une topographie non-invasive du cerveau (figure 5.10).

L'utilisation combinée de 9 émetteurs et de 4 récepteurs, actifs à tour de rôle, a permis de définir 16 zones d'exploration cérébrale (figure 5.11). Quatre rats (n°7 à 10) ont subi le même protocole que celui décrit au paragraphe 5.2. Le dispositif a été placé sur la tête de l'animal de façon à ce que les 3 émetteurs centraux se situent au niveau du sinus veineux. De cette manière, 8 voxels ont été explorés dans l'hémisphère droit (hémisphère ischémié) et les 8 autres dans l'hémisphère gauche (contrôle non ischémié).

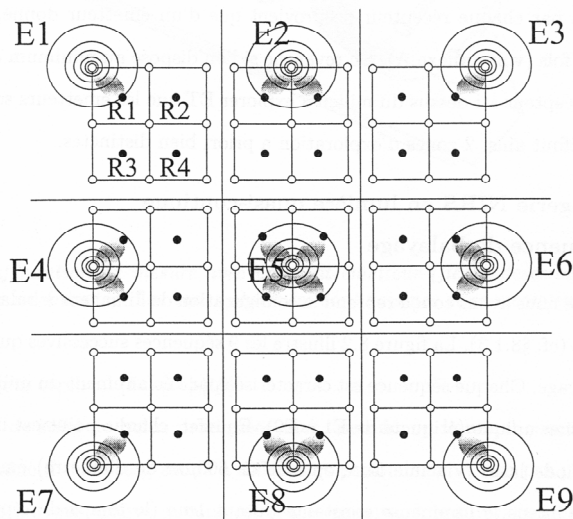


Figure 5.10 : Exemple de dispositif d'imagerie comprenant 9 émetteurs et 4 récepteurs. Les 9 cadrans (E1 à E9) montrent chacune des 9 configurations d'éclairage du système. Ces configurations sont exploitées successivement de gauche à droite et de bas en haut. Sur chaque cadran, le point d'éclairage est mis en évidence par des cercles concentriques. La zone de mesure d'intensité lumineuse correspondante apparaît en grisé.

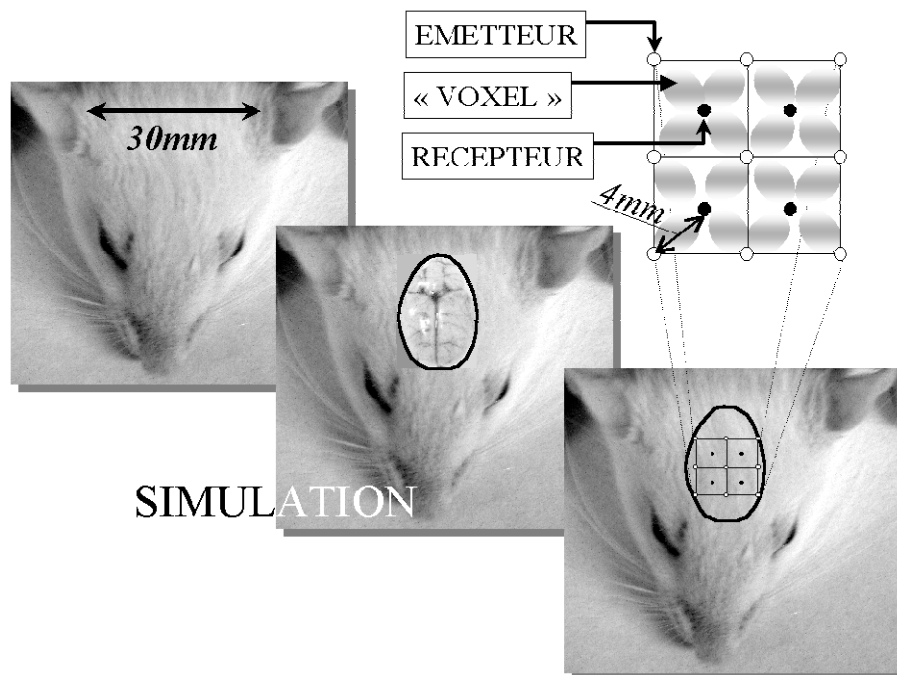


Figure 5.11 : Disposition des couples d'émetteur / récepteur sur la tête du rat permettant de définir 16 voxels d'exploration cérébrale.

L'animal a reçu deux bolus d'ICG de 0,05 ml à 0,06 g/l par voie fémorale IV durant la phase contrôle (avant occlusion de l'ACM) et durant la phase d'occlusion de l'ACM, les deux bolus d'une même phase étant séparés de 15 minutes. Cette concentration réduite a conduit à des variations d'intensité lumineuse suffisantes d'environ 15% et a assuré une linéarité entre l'atténuation mesurée et la concentration de colorant présent dans le milieu, ce qui a permis la déduction de paramètres quantitatifs. La réduction du volume injecté a minimisé les fluctuations hémodynamiques dues à l'injection. Grâce à la répétition du bolus, la reproductibilité des mesures pendant chacune des phases a pu être évaluée (figure 5.12 et 5.13). La superposition des courbes issues des deux injections se fait en générale de façon correcte pendant la phase contrôle (figure 5.12). La variabilité spatiale observée entre les différents voxels paraît reproductible d'une injection à l'autre. Cette reproductibilité semble moins importante pendant la phase d'occlusion de l'ACM, probablement à cause d'une évolution temporelle de l'hémodynamique à l'intérieur de l'hémisphère ischémié au cours des 15 minutes de délai entre les deux injections.

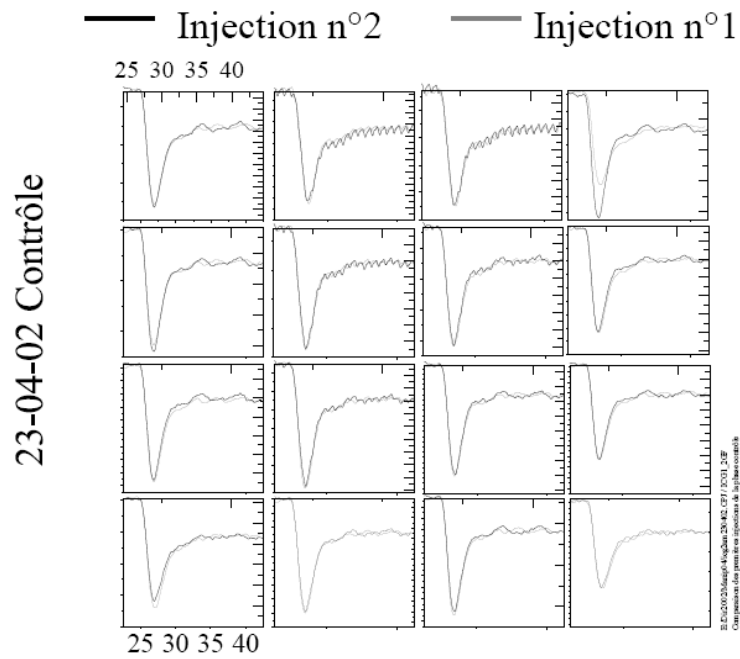


Figure 5.12 : Rat n° 7. Evaluation de la reproductibilité des courbes de bolus pendant la phase contrôle avant occlusion, suite à l'injection de deux bolus d'ICG à 15 minutes d'intervalle.

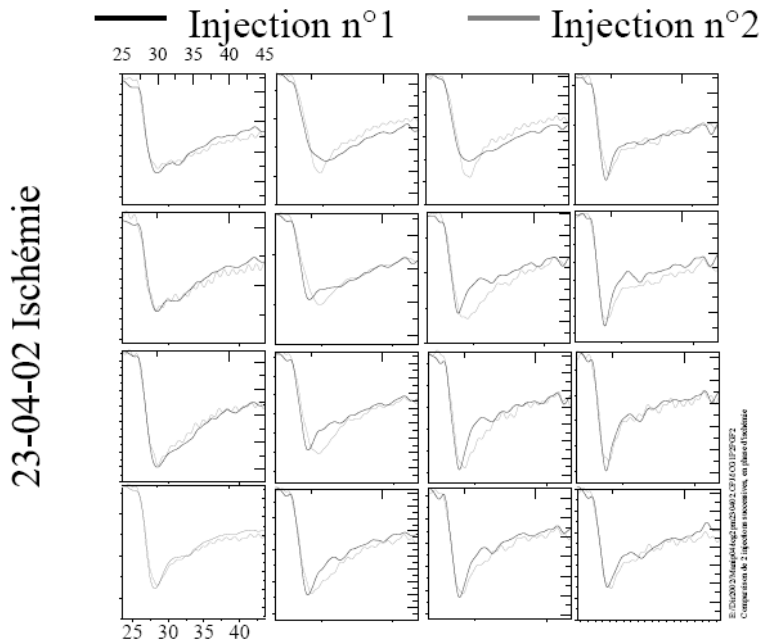


Figure 5.13 : Rat n°7. Evaluation de la reproductibilité des courbes de bolus pendant la phase d'occlusion, suite à l'injection de deux bolus d'ICG à 15 minutes d'intervalle.

La superposition des courbes obtenues pendant la phase contrôle et pendant la phase d'occlusion pour les 4 rats est illustrée dans les figures 5.14 et 5.15. La superposition des courbes de bolus en phase contrôle et en phase d'ischémie a été réalisée en prenant une origine des temps commune aux deux cartographies. Elle a été choisie de façon à ce que l'extremum de la courbe du voxel n°12 (hémisphère non ischémié, figure 5.14) soit le même dans les deux expériences. Cette superposition a permis de mettre en évidence un retard franc du bolus ainsi qu'un écrasement de la courbe pour certains voxels de l'hémisphère ischémié par rapport à l'hémisphère contrôle pour 3 des rats (n°7, 9 et 10). Cette observation est moins nette pour le 4^e rat (n°8). Les amplitudes de variation ne sont, quant à elles, pas comparables car les fibres optiques ont été déplacées entre la phase contrôle et la phase d'occlusion de l'ACM pour permettre la chirurgie. Bien que repositionnées avec soin selon des repères déterminés, le recalage de l'échelle d'amplitude du signal n'est pas possible et aucune interprétation des différences d'amplitude ne peut être avancée. Pour permettre une interprétation quantitative de ces résultats, une cartographie des temps d'arrivée a été réalisée (figures 5.16 à 5.19). Le temps d'arrivée de référence a été choisi arbitrairement comme celui calculé dans le voxel n°12 (figure 5.14). Les images en niveaux de gris ont ensuite été calculées par interpolation linéaire des données acquises à partir des 16 points de mesures. Les zones où le bolus est arrivé plus tardivement apparaissent en foncé. Ces images font apparaître de franches zones de retard dans la phase d'occlusion pour 2 des animaux (n° 7 et 10). Ces mêmes animaux avaient montré des distorsions de courbes dans les mêmes zones sur les cartographies de bolus et des signes évidents de dommages ischémiques à l'analyse histologique. L'interprétation des cartes de temps d'arrivée est délicate pour les deux autres rats (n° 8 et 9) qui n'avaient pas montré de signes histologiques d'ischémie.

Ces expériences d'imagerie de perfusion et leur interprétation quantitative en termes de cartographie des temps d'arrivée ont montré la possibilité de localiser spatialement et en temps réel un foyer ischémique. La reproductibilité du système sur 2 injections paraît satisfaisante au vu de la superposition des courbes de bolus obtenues en phase contrôle ou en phase d'occlusion. Cependant, le rapprochement des optodes dans cette configuration de cartographie a réduit la profondeur cérébrale explorée et pourrait représenter un facteur limitant dans la détection d'infarctus striataux profonds. Cette instrumentation apparaît fiable et prometteuse suite à ces expériences préliminaires mais d'autres essais seraient nécessaires pour valider la méthode et extraire des données quantitatives utiles telles que le temps de transit moyen, la fonction d'entrée artérielle et le DSC.

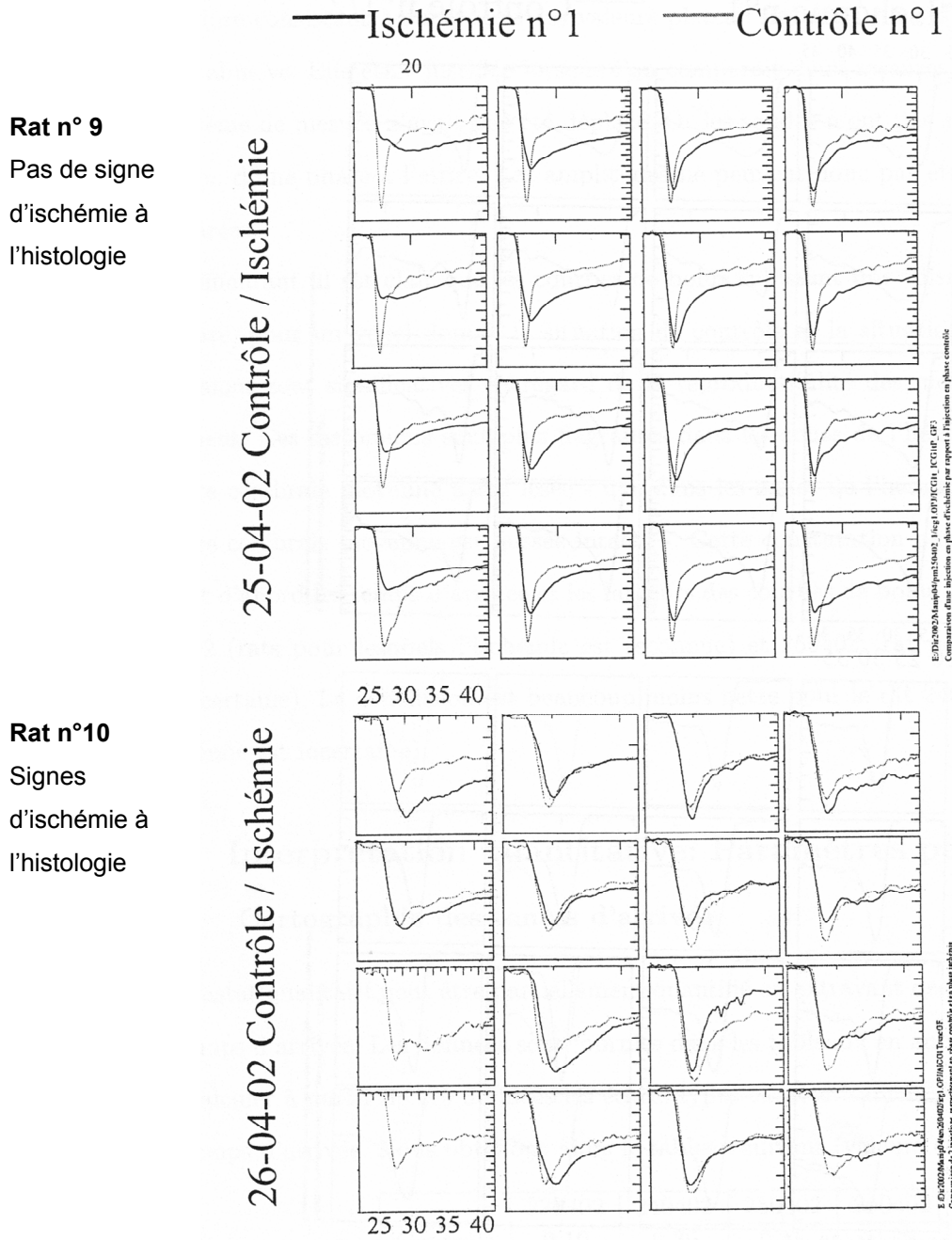


Figure 5.15 : Rats n° 9 et 10. Cartographies des courbes de bolus d'ICG. Comparaison de la phase contrôle et de la phase suivant l'occlusion de l'ACM.

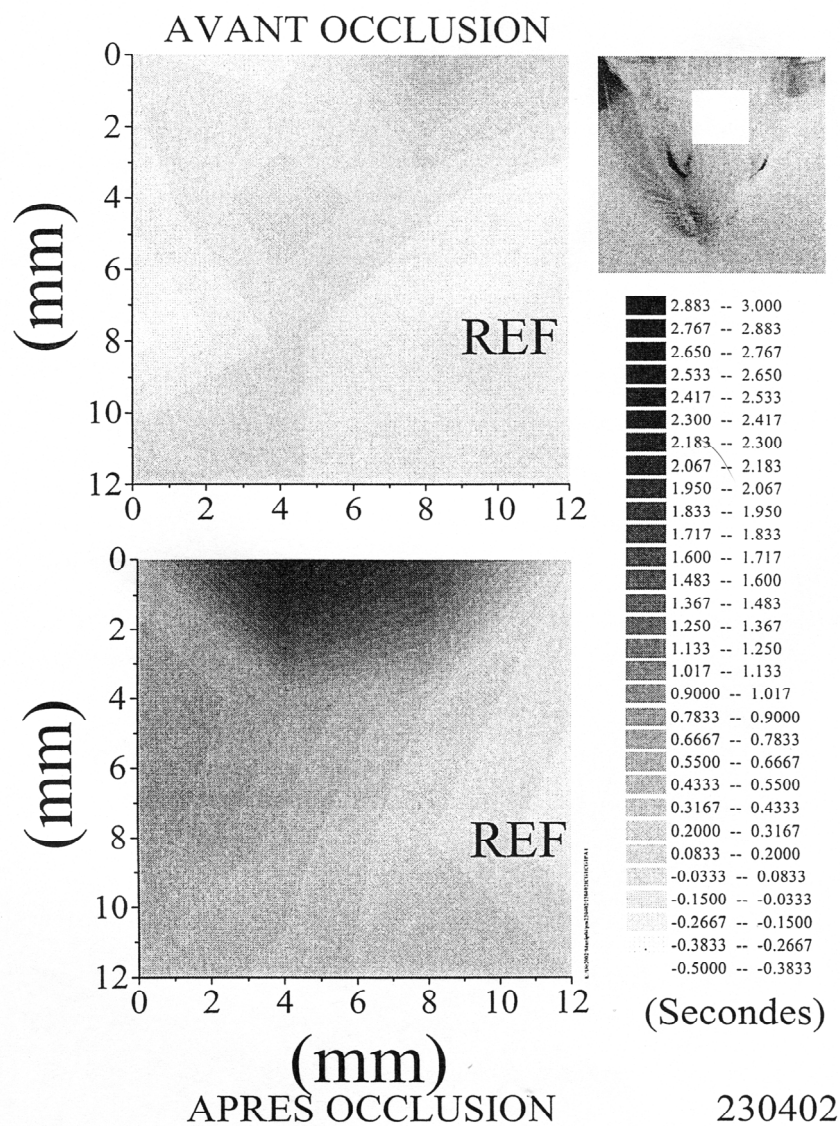


Figure 5.16 : Rat n° 7. Cartographie des temps d'arrivée du bolus d'ICG avant et après occlusion de l'ACM droite. Le carré blanc sur la tête du rat symbolise la zone explorée.

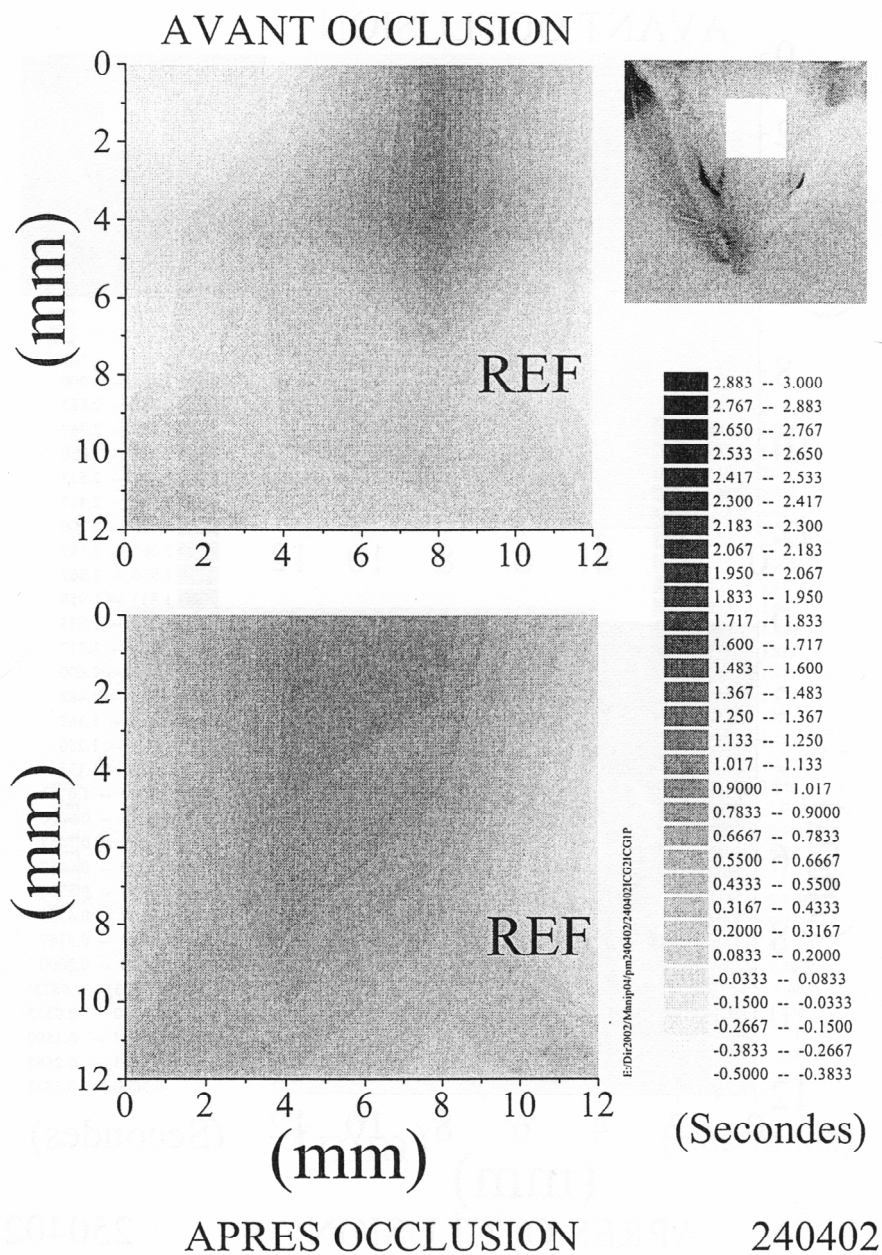


Figure 5.17 : Rat n°8. Cartographie des temps d'arrivée du bolus d'ICG avant et après occlusion de l'ACM droite. Le carré blanc sur la tête du rat symbolise la zone explorée.

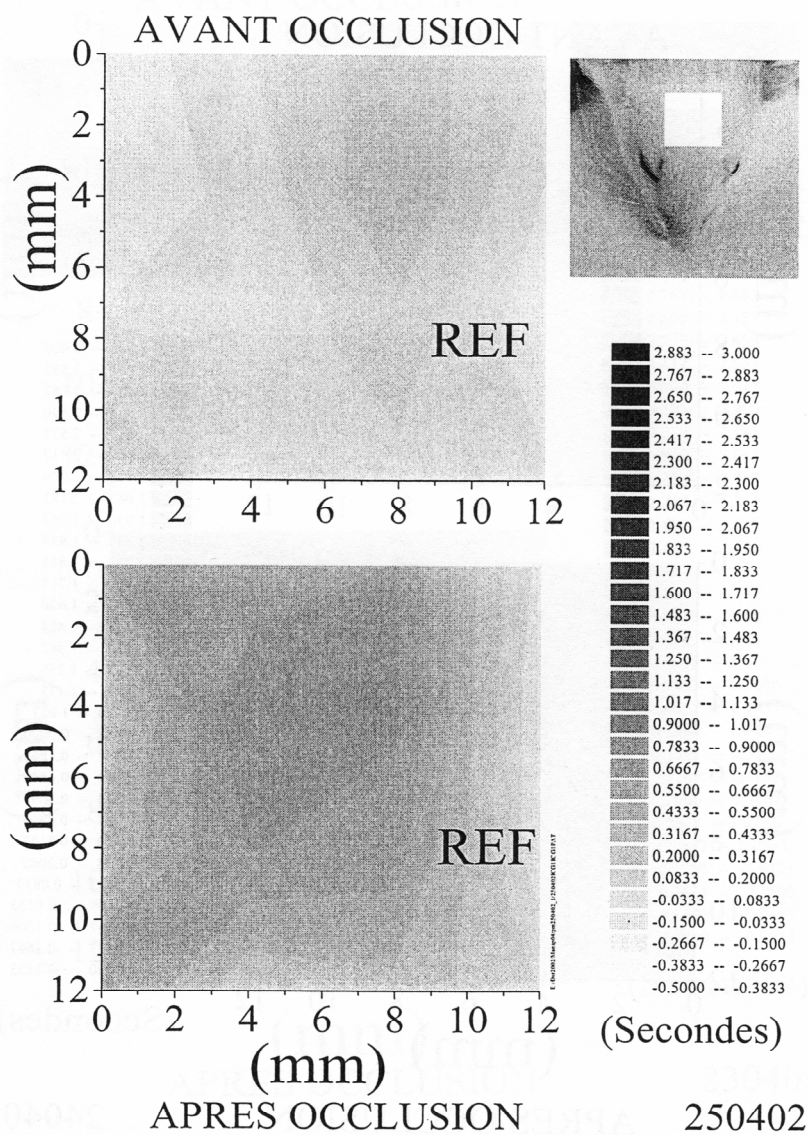


Figure 5.18 : Rat n°9. Cartographie des temps d'arrivée du bolus d'ICG avant et après occlusion de l'ACM droite. Le carré blanc sur la tête du rat symbolise la zone explorée.

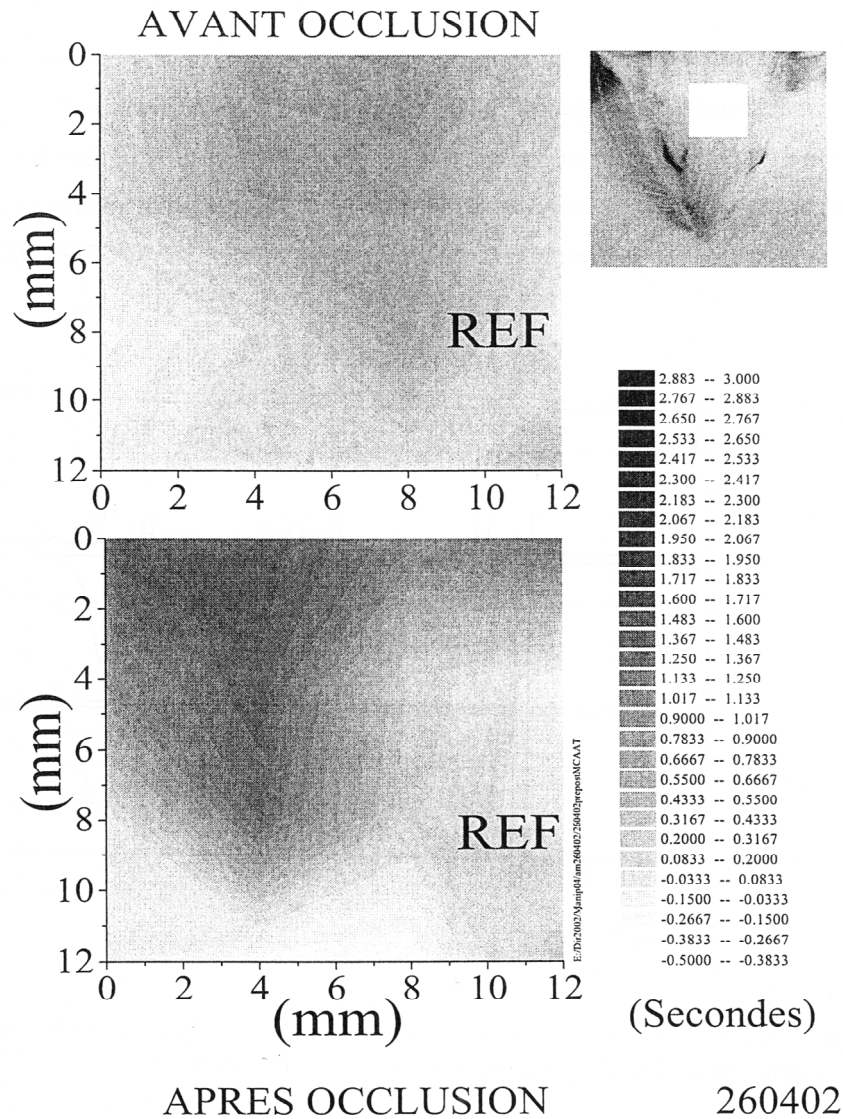


Figure 5.19 : Rat n°10. Cartographie des temps d'arrivée du bolus d'ICG avant et après occlusion de l'ACM droite. Le carré blanc sur la tête du rat symbolise la zone explorée.

5.4. Conclusion.

Ce chapitre a montré que la mesure de la cinétique d'un bolus d'ICG par NIRS permettait la détection de zones hypoperfusées chez le rat suite à l'occlusion unilatérale de l'ACM. L'instrumentation employée est simple et peu coûteuse et la fiabilité du système paraît encourageante au vu de la reproductibilité des courbes de bolus obtenues lors de ces premières expériences *in vivo*. Cette technique a l'avantage d'offrir une résolution temporelle importante qui a permis l'acquisition de données quasi simultanément dans différentes régions cérébrales pour la réalisation de cartes de bolus. Même si cette technique peut difficilement remplacer la tomodensitométrie par rayons X ou l'IRM en clinique pour le diagnostic initial d'un AVC, elle pourrait cependant constituer une méthode de choix pour le suivi d'un traitement homolytique ou pour le suivi des complications thromboemboliques lors d'une endartérectomie carotidienne. La méthode est non-invasive, répétitive, sans effet secondaire majeur et facilement entreprenable au lit du patient.

Actuellement, la NIRS est une technique bien établie et couramment employée chez le nouveau-né en soins intensifs où la transillumination est possible ⁴. Chez l'adulte, la technique est en pleine essor même si quelques limitations à son utilisation persistent. Il s'agit en particulier des patients agités pendant les mesures et de l'incertitude persistante sur la contribution du tissu extracérébral à la mesure. En effet, même si la NIRS semble refléter des changements significatifs des vaisseaux intracérébraux, ces changements ne peuvent pas être clairement distingués des changements intervenants dans les tissus extracérébraux. Son développement pour des applications d'imagerie fonctionnelle a en outre permis la mesure des changements de concentration de l'hémoglobine oxygénée dans le cortex d'adultes en réponse à une stimulation visuelle ¹⁵¹ ou à des tâches de calcul mental ²¹⁹.

L'utilisation de la NIRS dans notre laboratoire, en complément des techniques d'imagerie RMN, est très attrayante. Les mesures optiques sont parfaitement compatibles avec la présence d'un champ magnétique intense et permettent d'envisager la mesure simultanée de différents paramètres hémodynamiques dans le cadre de l'ischémie cérébrale, du traumatisme crânien, des tumeurs cérébrales ou de l'imagerie fonctionnelle. Par comparaison à la vélocimétrie laser doppler qui ne mesure que des variations de DSC, la variété de paramètres qui peuvent être mesurés par la NIRS (saturation en oxygène de l'hémoglobine, mesures absolues de DSC et de volume sanguin cérébral) contribuent largement à son potentiel. Cependant, il semblerait que ces deux techniques non-invasives puissent fournir des informations complémentaires sur le DSC et la réactivité vasomotrice cérébrale en explorant des profondeurs de tissu différentes. Alors que la vélocimétrie laser doppler fournit

principalement des informations sur les artères et artérioles, la NIRS serait capable d'explorer des territoires plus profonds et refléterait des modifications hémodynamiques et métaboliques des artérioles et capillaires corticaux²¹⁸. Ainsi, même si le laser doppler peut déjà permettre de contrôler en direct l'efficacité de l'occlusion et de la reperfusion de l'ACM dans l'ischémie cérébrale, la NIRS pourrait de surcroît permettre le suivi en continu de paramètres hémodynamiques pertinents supplémentaires.

Conclusion générale.

L'objectif de ce travail était de caractériser la microvascularisation cérébrale au cours d'une ischémie focale transitoire chez le rat.

Après une phase de mise au point du modèle animal d'ischémie cérébrale par occlusion intraluminale de l'ACM, nous nous sommes intéressés à la chronologie d'ouverture de la BHE au cours de la phase de reperfusion précoce. La rupture de la BHE est une complication majeure du traitement thrombolytique chez l'homme et constitue un risque accru d'œdème cérébral et de transformation hémorragique. La phase de reperfusion immédiate suivant l'occlusion a cependant été peu étudiée malgré son importance en clinique puisqu'elle correspond à la fenêtre thérapeutique d'administration du rt-PA. L'étude de l'extravasation de deux agents de contraste de poids moléculaires différents par IRM nous a permis de démontrer que l'ouverture de la BHE intervenait au cours de la première heure de reperfusion même après une période d'occlusion courte de 30 minutes dans ce modèle. Cette ouverture précoce de la BHE pourrait être mise à profit pour l'adjonction d'un traitement pharmacologique visant à réduire les complications de l'ischémie cérébrale ou de la thrombolyse.

Dans la deuxième étude de ce travail, l'effet de quatre anesthésiques (isoflurane, sévoflurane, thiopental et propofol) sur le développement de l'ischémie cérébrale a été évalué par histologie. Les anesthésiques, en prolongeant la durée pendant laquelle le cerveau pourrait tolérer une réduction de l'apport en oxygène, apparaissent comme des neuroprotecteurs potentiels. Le mécanisme précis par lequel ils réduisent les dommages cérébraux au cours de l'ischémie n'est pas clairement identifié mais pourrait impliquer leurs propriétés vasodilatatrices cérébrales. Or, ces propriétés vasodilatatrices pourraient avoir un retentissement sur le modèle expérimental lui-même en réduisant la sévérité des lésions ischémiques induites. Nous avons mesuré le DSC par autoradiographie chez la rat après deux heures d'occlusion de l'ACM et corrélé les informations obtenues avec l'état histologique du tissu déterminé par une coloration à l'HE. Les résultats indiquent que le DSC pendant la phase d'occlusion est différent selon l'anesthésique considéré et que les volumes d'œdème observés à deux heures d'occlusion de l'ACM montrent des disparités importantes. Ces observations mettent en évidence un effet de l'anesthésique sur le développement de l'ischémie cérébrale et soulignent l'importance de prendre en considération les conditions expérimentales dans les études sur modèles animaux. Cette deuxième partie a également permis de constater la faiblesse de notre modèle d'occlusion intraluminale de l'ACM à travers la faible reproductibilité des lésions ischémiques induites.

La troisième étude de ce travail a été menée en collaboration avec le laboratoire de spectrométrie physique de Grenoble et a consisté à mettre au point un nouvel outil d'exploration de l'hémodynamique cérébrale par spectroscopie proche-infrarouge et à l'évaluer sur notre modèle d'ischémie cérébrale. La détection optique d'un bolus intraveineux d'ICG, de façon non-invasive et simultanée dans les deux hémisphères cérébraux d'un animal, a permis de valider la méthode et de mettre en évidence un retard du temps d'arrivée de ce colorant dans l'hémisphère ischémié par rapport à l'hémisphère controlatéral. Des expériences d'imagerie ont été réalisées pour mesurer la perfusion cérébrale locale dans seize voxels et cartographier les temps d'arrivée du bolus d'ICG lors d'une occlusion de l'ACM. Grâce à cette augmentation de la résolution spatiale, la potentialité de cette instrumentation spécifique à détecter et à localiser en temps réel un foyer ischémique a été démontrée.

Plusieurs perspectives intéressantes ressortent de ces études :

De façon générale, il apparaît qu'une amélioration du modèle d'occlusion intraluminale de l'ACM est nécessaire pour aboutir à l'obtention de lésions cérébrales plus homogènes en taille et en localisation spatiale. Le taux d'occlusion a déjà été amélioré par la calibration du diamètre du filament occlusif mais une variabilité dans la position de l'embout semble persister malgré le choix d'un repère anatomique invariable. La mise en place d'un contrôle de la chute du DSC au niveau de l'ACM au moment de l'occlusion par vélocimétrie laser doppler pourrait probablement résoudre ces difficultés. Cette technique offre l'avantage de pouvoir procéder en temps réel à une correction de la position du filament.

L'étude sur la perméabilité de la BHE après reperfusion a montré une ouverture très précoce compatible avec la fenêtre d'administration thérapeutique du rt-PA. Cette modification non observée en IRM auparavant suscite un intérêt clinique important en offrant une possibilité d'acheminer des médicaments au cerveau. Cette augmentation de perméabilité mériterait d'être vérifiée par une technique conventionnelle de référence (histologie) et d'être morphologiquement mieux caractérisée. La nature des mécanismes mis en jeu (modification des jonctions serrées, augmentation de la transcytose) pourrait être précisée par l'utilisation de la microscopie électronique et le marquage immunologique des constituants de la BHE.

Dans le chapitre 4 concernant l'effet de différents anesthésiques, le DSC pendant la période d'occlusion et les lésions ischémiques induites à deux heures d'occlusion ont été évalués. D'un point de vue clinique, il semblerait intéressant d'évaluer les dommages cellulaires induits à plus long terme (infarctus final) ainsi que de mesurer

le DSC après reperfusion afin de tester l'hypothèse selon laquelle les anesthésiques halogénés pourraient atténuer l'hypoperfusion post-ischémique et améliorer ainsi la récupération neuronale. Une étude statistique mieux adaptée aux données semble également nécessaire au vu de l'inadéquation entre les tendances observées et le manque de significativité des résultats. Enfin, le développement de techniques d'IRM de perfusion permettrait, comme l'autoradiographie, de mesurer le DSC tout en effectuant un suivi longitudinal de l'animal au cours des différentes phases de l'ischémie.

Comme nous l'avons vu dans la dernière étude, la spectroscopie proche-infrarouge pourrait sans doute remplir la même fonction que le laser doppler tout en permettant d'accéder à des paramètres hémodynamiques supplémentaires et quantitatifs tels que la saturation en oxygène, le volume ou le débit sanguin cérébral. Elle pourrait s'avérer être un outil intéressant complémentaire de l'IRM pour l'étude de l'ischémie cérébrale mais nécessite encore l'acquisition d'un appareillage spécifique et des compétences en optique extérieures au laboratoire.

Annexes.

Liste des publications réalisées durant la thèse.

Article en révision soumis à NMR in Biomedicine.

Grillon E, Provent P, Montigon O, Segebarth C, Remy C, Barbier EL.

Blood-Brain Barrier Permeability to Manganese and to Gd-DOTA in a Rat Model of Transient Cerebral Ischemia.

Articles publiés dans le cadre de collaborations.

1- Barbier E L, Liu L, Grillon E, Payen J F, Lebas J F, Segebarth C, Remy C (2005) Focal brain ischemia in rat: acute changes in brain tissue T(1) reflect acute increase in brain tissue water content. NMR Biomed 18: 499-506

2- Barbier E L, St Lawrence K S, Grillon E, Koretsky A P, Decorps M (2002) A model of blood-brain barrier permeability to water: accounting for blood inflow and longitudinal relaxation effects. Magn Reson Med 47: 1100-1109

3- Choquet P, Hyacinthe J, Duhamel G, Grillon E, Levie J, Constantinesco A, Ziegler A (2003) Method to determine in vivo the relaxation time T1 of hyperpolarized xenon in rat brain. Magn Reson Med 49: 1014-1018

4- Duhamel G, Choquet P, Grillon E, Lamalle L, Levie J L, Ziegler A, Constantinesco A (2001) Xenon-129 MR imaging and spectroscopy of rat brain using arterial delivery of hyperpolarized xenon in a lipid emulsion. Magn Reson Med 46: 208-212

5- Duhamel G, Choquet P, Grillon E, Levie J L, Decorps M, Ziegler A, Constantinesco A (2002) Global and regional cerebral blood flow measurements using NMR of injected hyperpolarized xenon-129. Acad Radiol 9 Suppl 2: S498-500

6- Duhamel G, Choquet P, Levie J L, Steibel J, Lamalle L, Julien C, Kober F, Grillon E, Derouard J, Decorps M, Ziegler A, Constantinesco A (2000) In vivo 129Xe NMR in rat brain during intra-arterial injection of hyperpolarized 129Xe dissolved in a lipid emulsion. C R Acad Sci III 323: 529-536

7- Julien C, Bradu A, Sablong R, Grillon E, Remy C, Derouard J, Payen J (2006) Measuring hemoglobin oxygen saturation during graded hypoxic hypoxia in rat striatum. Anesth Analg 102: 565-570

8- Julien C, Payen J, Tropes I, Farion R, Grillon E, Montigon O, Remy C (2004) Assessment of vascular reactivity in rat brain glioma by measuring regional blood volume during graded hypoxic hypoxia. Br J Cancer 91: 374-380

9- Seegers H, Grillon E, Trioullier Y, Vath A, Verna J M, Blum D (2000) Nuclear factor-kappa B activation in permanent intraluminal focal cerebral ischemia in the rat. Neurosci Lett 288: 241-245

10- Tropres I, Grimault S, Vaeth A, Grillon E, Julien C, Payen J F, Lamalle L, Decorps M (2001)
Vessel size imaging. Magn Reson Med 45: 397-408

11- Ziegler A, Hyacinthe J, Choquet P, Duhamel G, Grillon E, Leviel J, Constantinesco A (2004)
Laser-polarized xenon nuclear magnetic resonance, a potential tool for brain perfusion imaging:
measurement of the xenon T1 in vivo. Methods Enzymol 385: 149-165

NMR IN BIOMEDICINE
NMR Biomed. 2005; 18: 499–506
Published online 3 October 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI:10.1002/nbm.979

Focal brain ischemia in rat: acute changes in brain tissue T_1 reflect acute increase in brain tissue water content

Emmanuel L. Barbier,^{1*} Lijun Liu,^{1,2} Emmanuelle Grillon,¹ Jean-François Payen,¹ Jean-François Lebas,¹ Christoph Segebarth¹ and Chantal Rémy¹

¹INSERM, Université Joseph Fourier, UM 594, Neuroimagerie Fonctionnelle et Métabolique, Laboratoire de Recherche Conventionné du CEA No. 30V, Centre Hospitalier Universitaire Albert Michallon, Pavillon B, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9, France

²Department of Emergency and Critical Care Medicine of the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China

Received 22 October 2004; Revised 4 May 2005; Accepted 6 July 2005

ABSTRACT: Several recent studies have reported changes of brain tissue T_1 in ischemic models during the first minutes after occlusion of the middle cerebral artery (MCA). In order to assess whether these tissue T_1 changes are related to an increase in tissue water content, we performed T_1 (7T) and tissue water content measurements in a rat model ($n = 10$, Sprague-Dawley) of focal cerebral ischemia (intraluminal occlusion model). The tissue water content was determined using a gravimetric technique. The animals were divided into two groups: an ischemic group, with an effective MCA occlusion ($n = 6$) and a control group, with animals having undergone sham surgery but no MCA occlusion ($n = 4$). In the ipsilateral cortex, the tissue water content was $81.1 \pm 0.7\%$ at 2 h 15 min following ischemic insult (contralateral value: $79.3 \pm 0.5\%$). Concomitantly, the tissue T_1 in the ipsilateral cortex was 2062 ± 60 ms at ischemia onset +1 h (contralateral 1811 ± 28 ms) and 2100 ± 38 ms at ischemia onset +2 h (contralateral 1807 ± 18 ms). The tissue T_1 and tissue water content values measured in the contralateral area do not differ from the values obtained in the control group. A significant T_1 increase is observed at ischemia onset +1 h (+14%) and ischemia onset (+2 h) +16%, together with a significant increase in tissue water content (+2.3%). This suggests that there is an increase in tissue water content concomitant with cell swelling during the first hours of ischemia. Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: rat; edema; animal; gravimetry; inversion-recovery; vasogenic; cytotoxic

INTRODUCTION

The dynamic equilibrium between the blood hydrostatic pressure (mean arterial blood pressure) and the intracranial pressure maintains the cerebral perfusion pressure. The regulation of this parameter can be affected by the occurrence of an edema. Two types of edema are generally described in edema-prone brain injuries such as stroke or trauma.¹ The vasogenic edema induces an increase in the tissue water content, which can be detected via the associated increase in the average T_1 of the water protons in the voxel.^{2–5} The cytotoxic edema is

related to cell swelling. The reduction of the extracellular space volume induces a reduction in the apparent diffusion coefficient (ADC) but the total water content and T_1 are not modified.^{2,6}

Recently, increases in brain tissue T_1 in animal models of ischemia during the first minutes following occlusion of the middle cerebral artery have been reported (MCA).^{7–11} Because this T_1 increase occurs within minutes after MCA occlusion, it cannot be explained by the appearance of a vasogenic edema, which is considered to occur only hours after MCA occlusion.¹² Therefore, an increase in tissue water content has not been considered as a possible explanation for this T_1 increase and other causes have been suspected:⁷ changes in tissue temperature,¹³ paramagnetic molecule concentrations (oxygen or hemoglobin),¹⁰ tissue protein content,⁸ blood volume⁵ and blood flow.¹⁰

In order to assess the extent to which the brain tissue T_1 change observed in a rat model of ischemia is related to an increase in tissue water content, this study reports measurements of tissue T_1 at 7T and of tissue water content using the gravimetric technique in the same animals.³

*Correspondence to: Emmanuel L. Barbier, INSERM, Université Joseph Fourier, UM 594, Neuroimagerie Fonctionnelle et Métabolique, Laboratoire de Recherche Conventionné du CEA No. 30V, Centre Hospitalier Universitaire Albert Michallon, Pavillon B, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9, France.
E-mail: emmanuel.barbier@ujf-grenoble.fr
Contract/grant sponsors: CNRS/INSERM/CEA; Région Rhône-Alpes.

Abbreviations used: ADC, apparent diffusion coefficient; BBB, blood-brain barrier; CBV, cerebral blood volume; FLASH, fast low-angle snapshot; MCA, middle cerebral artery; ROI, region of interest; SG, specific gravity; T_1 , inversion time

MATERIALS AND METHODS

Animal preparation

All operative procedures and animal care conformed strictly to French government guidelines (licenses 380321, A3851610004 and B3851610003). Sixteen adult male Sprague–Dawley rats (318 ± 15 g) were used in this study. Six animals were used to calibrate the gravimetric measurement of tissue water content. Ten other animals were used for imaging and for tissue water content measurement. Anesthesia was induced with 5% isoflurane in 30% O₂–70% air and maintained throughout the preparation with 1.5–2% isoflurane. Rats were tracheostomized and artificially ventilated with a volume-controlled ventilator (CWE Inc., Ardmore, PA, USA) at about 60 strokes/min. Arterial and venous catheters were placed in the femoral vessels. Rectal temperature was maintained at $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ throughout the experiment with a feedback-controlled heating pad connected to a rectal probe (electrical blanket for surgery, water blanket for MRI). Arterial blood pressure was continuously monitored. Blood samples were withdrawn for blood gas analysis at the beginning and end of the MRI experiment.

Focal brain ischemia was induced by intraluminal occlusion of the right MCA.¹⁴ Briefly, the right carotid arterial tree was isolated and a cylinder of melted adhesive (length 2 mm, diameter 0.38 mm) attached to a nylon thread (diameter 0.22 mm) was advanced from the lumen of the external carotid artery into the internal carotid artery up to 5 mm after the external skull base. For imaging, the animal was placed in a cradle and its head was maintained with ear bars.

Magnetic resonance imaging

Imaging was performed on a horizontal 7 T magnet (20 cm bore; Magnex Scientific Ltd., Oxford, UK) equipped with a 200 mT/m gradient system. A quadrature volume coil (Rapid Biomedical GmbH, Rimpfing, Germany; internal diameter 79 mm) was used for excitation and detection.

A three-dimensional flow-compensated gradient-echo sequence was used to obtain an angiogram ($TR/TE = 70/9$ ms, field of view = $36 \times 36 \times 8$ mm, matrix = $196 \times 192 \times 32$) in order to assess the MCA occlusion 30 min after ischemia onset. All the subsequent images were obtained from a 2 mm thick coronal slice, positioned at a distance of 7 mm from the surface between the olfactory bulb and the frontal lobe. With this reference, the position of the coronal slice corresponded approximately to bregma -0.5 ± 0.5 mm.

A spin-echo sequence was used to delineate the edematous region 1 h 45 min after occlusion: $TR/TE = 2000/80$ ms, field of view = 40×40 mm, matrix = 128×66 , two averages. A first image was acquired in the

absence of diffusion weighting. Subsequently, three images were acquired with a diffusion gradient ($b = 550$ s/mm²) applied in each of three orthogonal directions. ADC maps were generated pixel-by-pixel using the equation described by Stejskal and Tanner¹⁵ and by computing the average of the ADC values obtained in the three directions.

An inversion–recovery FLASH sequence¹⁶ was used to produce T_1 maps at 1 and at 2 h after ischemia onset: 22 inversion times (TI) ranging between 20 and 9000 ms, recovery time after imaging and prior to the next 180° pulse = 10 s, imaging $TR/TE = 5.7/3.2$ ms, field of view = 40×40 mm, matrix = 64×64 , two averages. Inversion was obtained with a non-selective adiabatic RF pulse in order to avoid possible flow contributions to the signal.¹⁷ T_1 maps were computed by fitting the data pixel wise to

$$M(TI) = |M_0[1 - 2c \exp(-TI/T_1)]| \quad (1)$$

where M_0 , c and T_1 are the fitted parameters.

Gravimetric measure of tissue water content

After imaging, the animal was killed by an intracardiac injection of KCl (~ 2 h 15 min after occlusion). The brain was rapidly removed and placed in a dry Petri box surrounded with ice. After a few minutes, the brain tissue was firm and the gravimetric analysis was performed according to the technique described by Marmarou *et al.*³ The specific gravity (SG) was determined in a layered kerosene–bromobenzene linear column. Prior to each brain analysis, the column was calibrated using 5 μL drops of four solutions of potassium sulfate in distilled water with known SGs (1.045, 1.040, 1.030 and 1.025).

Tissue water content for the animals in the ischemic group

A 2 mm thick coronal slice was cut through the ischemic lesion (centered on bregma -0.5 ± 0.5 mm) using a rat brain matrix. Seven tissue samples, 1×1 mm each, were obtained from four different brain regions (left cortex, right cortex, left striatum and right striatum), yielding a total of 28 tissue samples for each rat. SG was measured for each sample. For each brain region, the highest and the lowest SG values were discarded in order to eliminate a possible destabilizing effect from outliers and the average SG was determined from the five remaining values.

Calibration of the relation between tissue SG and tissue water content

The six other animals used to calibrate the relation between tissue SG and tissue water content underwent the same surgical procedure as the animals in the ischemic group, with the exception that the filament was not advanced up to the middle cerebral artery so as

to avoid ischemia. The SG of each tissue sample was determined and also the ratio dry weight/wet weight (dry tissue was obtained after a 24h stay in a 100°C oven).

Data analysis

Analysis of the MR data

Four regions of interest (ROIs) were manually drawn on the ADC maps: right cortex, left cortex, right striatum and left striatum. Right cortex and right striatum regions were obtained from the brain area displaying a reduced ADC value. These ROIs were subsequently transferred on to the T_1 maps.

Relation between tissue SG and tissue water content

The relation described by Marmarou *et al.*³ was employed:

$$[\text{H}_2\text{O}] (\%) = (m/\text{SG}) + b \quad (2)$$

where $[\text{H}_2\text{O}]$ is the tissue water content fraction and m and b depend on the specific gravity of the dried tissue sample; m and b were obtained by fitting eqn (2) to the $[\text{H}_2\text{O}]$ and SG values.

Relation between tissue water content and T_1

The approach proposed by Fatouros *et al.*⁴ was chosen to analyze the relation between tissue water content and T_1 . Briefly, this model assumes the existence of two water pools, 'free' and 'bound', between which protons are in fast exchange. Under these assumptions, $1/T_1$ and $1/[\text{H}_2\text{O}]$ are linearly related.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SD. The statistical significance of the differences between ipsilateral and contralateral values obtained from the same animal or between values obtained in the same region from the same animal at different times was assessed by a paired Student's t -test. The statistical significance of the differences between the values from the ischemic and from the control groups was assessed by a Student's t -test. In both cases, the threshold of statistical significance was set at $p = 0.01$.

Table 1. Systemic values for all animals imaged: blood gases values are presented for each of the two blood samples withdrawn during the MRI experiment ('Beginning' and 'End')

	Ischemic group ($n = 6$)		Control group ($n = 4$)	
	Beginning	End	Beginning	End
PaO ₂ (mmHg)	162 \pm 22	145 \pm 22	209 ^a \pm 11	169 ^b \pm 10
PaCO ₂ (mmHg)	36 \pm 7	41 \pm 9	33 \pm 5	40 \pm 5
Arterial pH	7.37 \pm 0.03	7.31 \pm 0.05	7.43 \pm 0.03	7.32 \pm 0.03
Mean arterial blood pressure (mmHg)	Entire experiment 68 \pm 10		Entire experiment 73 \pm 17	
Temperature (°C)	37.1 \pm 0.1		37.1 \pm 0.2	

^a Difference between ischemic and control groups ($p < 0.01$).

^b Difference between beginning and end ($p < 0.01$).

RESULTS

Animal physiology

For all animals, systemic parameters were within normal limits (Table 1). Blood gases (PaCO₂, pH and PaO₂) measured at the beginning and end of the MR experiments did not present any significant differences for the ischemic group, but the controls presented a reduction in PaO₂ (-41 mmHg on average) and an increase in PaCO₂ (+6.6 mmHg on average) between the two sampling times. The control and ischemic groups differed only in PaO₂ at the first sampling time. Arterial blood pressure and rectal temperature did not present significant variations over time and did not differ between the control and ischemic groups. Thus, despite the difference in blood gases observed at the beginning of the experiment, the control and ischemic groups presented comparable physiological status.

Calibration of the relations between tissue SG and tissue water content

The following relations were obtained between the measurements of tissue SG and tissue water content:

$$\text{For the cortex: } [\text{H}_2\text{O}] (\%) = (445.6/\text{SG}) - 345.6$$

$$\text{For the striatum: } [\text{H}_2\text{O}] (\%) = (497.6/\text{SG}) - 397.9$$

The m and b values found for the cortex are in good agreement with those found in the literature.^{3,5} No values were found in the literature for the rat striatum.

ADC, T_1 and tissue water content

Figure 1 shows an example of the images collected on one animal: the angiogram, used to assess MCA occlusion [Fig. 1(a)], the ADC map, on which the four ROIs were drawn [Fig. 1(b)] and the T_1 maps [Fig. 1(c) and (d)] obtained at 1 and 2 h, respectively. It can be observed

502

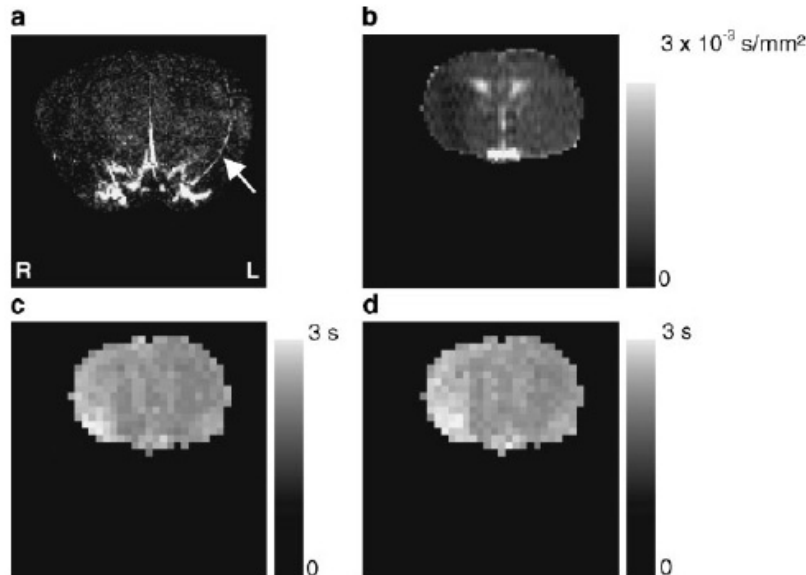
E. L. BARBIER *ET AL.*

Figure 1. Four MR images from the same animal: (a) maximum intensity projection of the three-dimensional flow-compensated gradient-echo sequence (angiogram), showing the perfused MCA in the left hemisphere (arrow) and the absence of flow in the MCA on the right side (L, left; R, right); (b) ADC map obtained 1 h 40 min after ischemia onset; (c) and (d) T_1 maps obtained 1 and 2 h after occlusion, respectively

that the area in which the ADC is reduced corresponds to the area in which T_1 is increased.

Figure 2 shows ADC, T_1 and tissue water content measurements in the ischemic (gray bars) and control (white bars) groups. In the ischemic group, both ipsilateral (right) regions (cortex, striatum) present a significant decreased ADC with respect to the contralateral regions (-42% on average) and with ipsilateral regions in the control group, a significant increased T_1 both at occlusion +1 h ($+15\%$ on average) and occlusion +2 h ($+18\%$ on average) and a significant increase in tissue water content ($+2.4\%$ on average). The contralateral values for ADC and T_1 (occlusion +1 h and +2 h) in the ischemic group do not differ from the values (ipsilateral or contralateral) measured in the control group. However, the tissue water content measured in the left striatum in the ischemic group differs from the values observed in the control group ($+0.6\%$ on average) [Fig. 2(c)]. This difference remains small compared with the change in tissue water content observed in the ischemic areas.

Table 2 reports T_1 measured at 1 and 2 h after MCA occlusion, water content and ADC values in the ischemic group. There are no significant differences between the T_1 measurements performed at 1 and 2 h following MCA occlusion.

Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

Figure 3(a) and (c) show that the relation between $1/T_1$ at occlusion +2 h and the inverse of tissue water content is consistent with the linear relation described by Fatouros *et al.*⁴ Indeed, the correlation coefficient r^2 between the two data sets is 0.84 for both ipsilateral cortex and ipsilateral striatum (if contralateral and ipsilateral data are grouped, r^2 remains above 0.75 for both cortex and striatum). Neither T_1 nor water content changes are observed in the contralateral hemisphere [Fig. 3(b) and (d)]. Conversely, one can observe in Fig. 3(d) that the control group differs from the ischemic group, as already seen in Fig. 2(c).

DISCUSSION AND CONCLUSION

In a rat model of brain ischemia, we observe that the brain water content is increased in the infarcted area 2 h after occlusion. ADC and T_1 values from both groups (control and ischemic) are in good agreement with corresponding values found in the literature.^{7,10,17,18} Water content values are also in good agreement with those found in the literature: for the water content of rat gray matter, Lin *et al.* measured $81.8 \pm 1.3\%$,¹³ Naruse *et al.* 80.1% ² and Barzo *et al.* $78.6 \pm 0.2\%$,¹⁹ whereas in the present study

NMR Biomed. 2005;18:499–506

ACUTE CHANGES IN BRAIN WATER DURING FOCAL ISCHEMIA

503

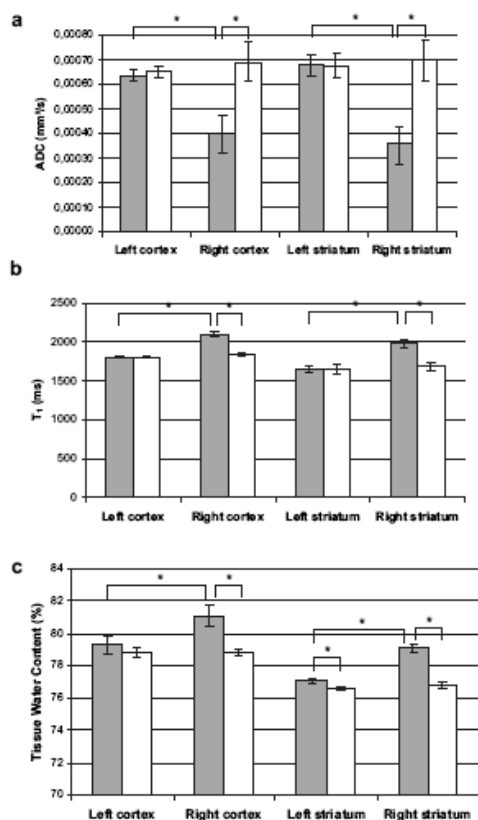


Figure 2. (a) Mean ADC values at occlusion +1 h 40 min, (b) mean T_1 values at occlusion +2 h and (c) mean tissue water content fraction at occlusion +2 h 15 min. Gray bars represent animals with a right MCA occluded and white bars control animals. Error bars represent one standard deviation. The asterisk denotes a significant difference ($p < 0.01$)

$79.3 \pm 0.5\%$ was found. For the rat striatum, the value of $77.1 \pm 0.2\%$ measured in this study is consistent with the value of 77% measured in the caudate nucleus by Barzo *et al.*¹⁹

This study also indicates that tissue T_1 varies with the tissue water content. The increase in tissue T_1 observed 1 h after ischemia onset suggests that the brain tissue water content has already increased at that time. Concomitantly, the ADC in the ischemic area decreases, an observation generally ascribed to cell swelling taking place immediately after ischemia onset.²⁰ Although the ADC has been observed to decrease within minutes after MCA occlusion,²¹ the exact mechanism leading to the ADC decrease remains unknown.^{21,22}

A T_1 increase minutes and hours after MCA occlusion has been reported in other studies.^{7-9,11} However, this

Table 2. T_1 , water content and ADC values for all animals

Duration after occl.	Ischemic group (n = 6)						Control group (n = 4)					
	Cortex			Striatum			Cortex			Striatum		
	Ipsi	Contra		Ipsi	Contra		Ipsi	Contra		Ipsi	Contra	
T_1 (ms)	2062 ± 60 ^a	1811 ± 28		1954 ± 50 ^a	1654 ± 47		1788 ± 17	1799 ± 30		1682 ± 65	1644 ± 70	
T_1 (ms)	2100 ± 38 ^a	1807 ± 18		1978 ± 54 ^a	1651 ± 42		1835 ± 21	1807 ± 9		1683 ± 47	1650 ± 57	
[H ₂ O] (%)	81.07 ± 0.65 ^a	79.26 ± 0.50		79.09 ± 0.25 ^a	77.08 ± 0.14		78.82 ± 0.21	78.83 ± 0.25		76.78 ± 0.22	76.60 ± 0.12	
ADC ($\times 10^{-3}$ s/mm ²)	0.40 ± 0.07 ^a	0.64 ± 0.02		0.36 ± 0.07 ^a	0.68 ± 0.04		0.69 ± 0.08	0.65 ± 0.03		0.70 ± 0.08	0.68 ± 0.05	

^aDifference between ipsi- and contralateral regions ($p < 0.01$).

504

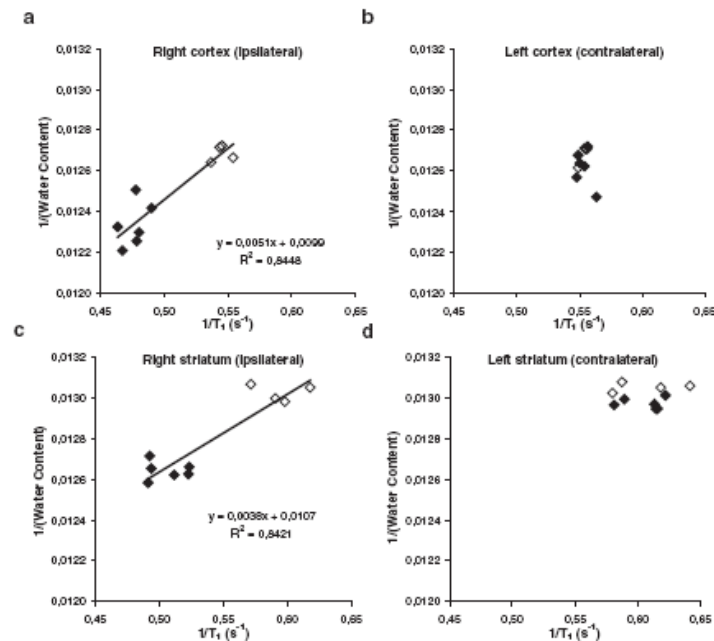
E. L. BARBIER *ET AL.*

Figure 3. Inverse of tissue water content as a function of $1/T_1$ for (a) right cortex, (b) left cortex, (c) right striatum and (d) left striatum. The equations in (a) and (c) describe the linear fit to the data. Closed diamonds represent ischemic animals and open diamonds control animals

increase has not been associated with an increased tissue water content. Indeed, increased tissue water content is generally associated with vasogenic edema,^{1,2} which does not occur within a few hours after MCA occlusion.¹² Even if tissue T_1 varies with tissue water content, one may not exclude the possibility that one or several other factors may have contributed to the observed changes in T_1 :

1. Owing to the higher specific gravity of blood with respect to tissue, a reduction in cerebral blood volume (CBV) can lead to a decrease in the average sample specific gravity and thereby to an overestimation of the tissue water content.²³ However, it has been shown that even a change in CBV of 100% would produce a negligible change in tissue water content.²⁴ Moreover, a CBV reduction would produce a decrease rather than an increase in the observed T_1 : the blood T_1 (~ 2300 ms at $7T_1^{17}$) is larger than the normal or edematous tissue T_1 measured in this study and a non-selective inversion pulse was used to avoid inflow effects in the tissue T_1 measurement.
2. A reduction in cerebral blood flow can produce an increase in the observed T_1 .¹⁰ However, the use of a non-selective inversion pulse to measure T_1 yields a

tissue T_1 value insensitive to flow variations. Moreover, if one had used a selective inversion pulse and considering the case of a dramatic flow reduction (from 2 ml/g/min prior to the occlusion to zero), tissue T_1 would be expected to increase by only $\sim 4\%$,¹⁷ whereas we report a 12–16% T_1 increase.

3. The rectal temperature was monitored and maintained constant throughout the experiment (Table 1). Busto *et al.*, however, have reported that the rectal temperature is not representative of the brain temperature.²⁵ Brain temperature decreased by 7°C in a four-vessel occlusion model²⁵ and by 3.1°C in a three-vessel occlusion model.²⁶ Based on these observations, Lin *et al.* suggested that the 7°C decrease in brain temperature observed by Busto *et al.* in a four-vessel occlusion ischemia model could produce a 10.5% decrease in T_1 .²⁷ In the case of MCA occlusion only, Chen *et al.* observed that the ischemic brain temperature did not decrease by more than 1°C during a 2 h occlusion period.²⁸ This temperature change would produce less than a 2% decrease in T_1 .
4. Calamante *et al.* ruled out the possible influence of paramagnetic deoxyhemoglobin on brain T_1 but they underlined that the decreased amount of dissolved O_2

in tissue could lead to an increase in the observed T_1 .¹⁰ This was not verified by Kettunen *et al.*, who showed that hypoxia does not affect T_1 .²⁹

5. A change in tissue water environment (protein size or protein conformation) could also take place, yielding a modification of the free water, hydration water and crystalline water proportions.³⁰ Such a change may have an impact on the tissue T_1 .^{4,8,10,30}
6. While it is generally agreed that vasogenic edema (i.e. accumulation of a protein-rich edema fluid in the extracellular space) does not occur prior to several hours after MCA occlusion, Petito reported an immediate (1 and 30 min) permeability of the blood-brain barrier (BBB) to horseradish peroxidase, via micropinocytosis.³¹ Conversely, Petito noticed that the BBB remained impermeable to Evans Blue-albumin. Pluta *et al.* reported an immediate (from 2 to 60 min) permeability of the BBB to horseradish peroxidase in a cardiac arrest model.³² Conversely, MRI approaches have not demonstrated an early BBB opening (< 2h) to gadolinium chelates in ischemia-reperfusion studies.³³

Assuming that the observed T_1 increase is due only to a water content increase, how can we interpret the data? Naruse *et al.* reported that pure cytotoxic edema does not lead to an increase in tissue T_1 and that a pure vasogenic edema leads to an increase in tissue water content, detectable through a tissue T_1 increase.² On the other hand, it is well known that vasogenic edema does not occur prior to hours after occlusion in the ischemia model.¹² This suggests that after MCA occlusion, both cell swelling and water content increase occur. Several mechanisms could explain an increase in tissue water content 1–2h after ischemia onset. The extra water could originate in blood or in tissue or have both origins. Considering a vascular origin for the extra water, this is related to the well-known permeability of the BBB to water.^{17,34} The mechanisms by which water is exchanged between intra- and extravascular compartments is not well understood, but one might reasonably assume that a change in the osmotic gradient between the two compartments would lead to a change in the water flow between them. Moreover, given that the BBB may become transiently permeable to large proteins within minutes following MCA occlusion,³¹ and given that neurotransmitter reuptake might be impaired,^{32,35} the BBB permeability to water could be transiently increased. Even in the context of a limited blood flow and considering a normal permeability (according to Schwarzbauer *et al.*³⁴ ~140 ml per 100 g per minute), e.g. a reduction of blood flow to 1 ml per 100 g per minute, it would take 2–3 min to bring into the voxel vascular space the extra amount of water observed in gray and white matter. A tissue origin for the extra water could be related to the appearance of an osmotic gradient between the ischemic

tissue and the normal surrounding tissue.³⁶ A gradient in tissue water content across the ischemic hemisphere has been observed by Simon *et al.* in a baboon model.³⁵

In conclusion, this study reports that the observed T_1 increase observed 2 h after ischemia onset and concomitant with the well-described decrease in ADC correlates with an increase of tissue water content.

Acknowledgements

The authors thank Gilles Francony for stimulating discussions. The INSERM/UJF UM 594 laboratory was the recipient of a grant 'Imagerie du Petit Animal' (CNRS/INSERM/CEA). L.L. was the recipient of a grant from Région Rhône-Alpes.

REFERENCES

1. Ayata C, Ropper AH. Ischaemic brain oedema. *J. Clin. Neurosci.* 2002; **9**: 113–124.
2. Naruse S, Horikawa Y, Tanaka C, Hirakawa K, Nishikawa H, Yoshizaki K. Proton nuclear magnetic resonance studies on brain edema. *J. Neurosurg.* 1982; **56**: 747–752.
3. Marmarou A, Tanaka K, Shulman K. An improved gravimetric measure of cerebral edema. *J. Neurosurg.* 1982; **56**: 246–253.
4. Fatouros PP, Marmarou A, Kraft KA, Inao S, Schwarcz FP. *In vivo* brain water determination by T_1 measurements: effect of total water content, hydration fraction and field strength. *Magn. Reson. Med.* 1991; **17**: 402–413.
5. Fatouros PP, Marmarou A. Use of magnetic resonance imaging for *in vivo* measurements of water content in human brain: method and normal values. *J. Neurosurg.* 1999; **90**: 109–115.
6. Schwarcz A, Berente Z, Osz E, Doczi T. *In vivo* water quantification in mouse brain at 9.4 Tesla in a vasogenic edema model. *Magn. Reson. Med.* 2001; **46**: 1246–1249.
7. Hoehn-Berlage M, Eis M, Back T, Kohno K, Yamashita K. Changes of relaxation times (T_1 , T_2) and apparent diffusion coefficient after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat: temporal evolution, regional extent and comparison with histology. *Magn. Reson. Med.* 1995; **34**: 824–834.
8. Ewing JR, Jiang Q, Boska M, Zhang ZG, Brown SL, Li GH, Divine GW, Chopp M. T_1 and magnetization transfer at 7 Tesla in acute ischemic infarct in the rat. *Magn. Reson. Med.* 1999; **41**: 696–705.
9. Lythgoe MF, Thomas DL, Calamante F, Pell GS, King MD, Busza AL, Sotak CH, Williams SR, Ordidge RJ, Gadian DG. Acute changes in MRI diffusion, perfusion, T_1 and T_2 in a rat model of oligemia produced by partial occlusion of the middle cerebral artery. *Magn. Reson. Med.* 2000; **44**: 706–712.
10. Calamante F, Lythgoe MF, Pell GS, Thomas DL, King MD, Busza AL, Sotak CH, Williams SR, Ordidge RJ, Gadian DG. Early changes in water diffusion, perfusion, T_1 and T_2 during focal cerebral ischemia in the rat studied at 8.5 T. *Magn. Reson. Med.* 1999; **41**: 479–485.
11. Grohn OH, Lukkarinen JA, Silvennoinen MJ, Pitkanen A, van Zijl PC, Kauppinen RA. Quantitative magnetic resonance imaging assessment of cerebral ischemia in rat using on-resonance T_1 in the rotating frame. *Magn. Reson. Med.* 1999; **42**: 268–276.
12. Garcia JH. Evolution of the brain lesion induced by experimental focal ischemia. In *Primer on Cerebrovascular Diseases*, Welch KM, Caplan LR, Reis DJ, Siesjö BK (eds). San Diego: Academic Press, 1997; 107–111.
13. Lin W, Venkatesan R, Gurleyik K, He YY, Powers WJ, Hsu CY. An absolute measurement of brain water content using magnetic resonance imaging in two focal cerebral ischemic rat models. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000; **20**: 37–44.

14. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; **20**: 84–91.
15. Skjjskal EO, Tanner JE. Spin diffusion measurements: spin-echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *J. Chem. Phys.* 1965; **42**: 288–292.
16. Haase A. Snapshot FLASH MRI. Applications to T1, T2 and chemical-shift imaging. *Magn. Reson. Med.* 1990; **13**: 77–89.
17. Barbier EL, St Lawrence KS, Grillon E, Koretsky AP, Decorps M. *In vivo* T1-measurement in the rat brain: accounting for blood inflow and water exchange effects. *Magn. Reson. Med.* 2002; **47**: 1100–1109.
18. Kettunen MI, Grohn OH, Lukkarinen JA, Vainio P, Silvennoinen MJ, Kauppinen RA. Interrelations of T(1) and diffusion of water in acute cerebral ischemia of the rat. *Magn. Reson. Med.* 2000; **44**: 833–839.
19. Barzo P, Marmarou A, Fatouros P, Hayasaki K, Corwin F. Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging. *J. Neurosurg.* 1997; **87**: 900–907.
20. Nicholson C, Sykova E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci.* 1998; **21**: 207–215.
21. Duong TQ, Ackerman JJ, Ying HS, Neil JJ. Evaluation of extra- and intracellular apparent diffusion in normal and globally ischemic rat brain via 19F NMR. *Magn. Reson. Med.* 1998; **40**: 1–13.
22. Sehy JV, Zhao L, Xu J, Rayala HJ, Ackerman JJ, Neil JJ. Effects of physiologic challenge on the ADC of intracellular water in the *Xenopus* oocyte. *Magn. Reson. Med.* 2004; **52**: 239–247.
23. Shigeno T, Brock M, Shigeno S, Fritschka E, Cervos-Navarro J. The determination of brain water content: microgravimetry versus drying-weighing method. *J. Neurosurg.* 1982; **57**: 99–107.
24. Picozzi P, Todd NV, Crockard AH. The role of cerebral blood volume changes in brain specific-gravity measurements. *J. Neurosurg.* 1985; **62**: 704–710.
25. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intraschemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1987; **7**: 729–738.
26. Hildebrandt-Eriksen ES, Christensen T, Diemer NH. Mild focal cerebral ischemia in the rat. The effect of local temperature on infarct size. *Neurol. Res.* 2002; **24**: 781–788.
27. Lin W, Paczynski RP, Venkatesan R, He YY, Powers WJ, Hsu CY, Haacke EM. Quantitative regional brain water measurement with magnetic resonance imaging in a focal ischemia model. *Magn. Reson. Med.* 1997; **38**: 303–310.
28. Chen H, Chopp M, Zhang ZG, Garcia JH. The effect of hypothermia on transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1992; **12**: 621–628.
29. Kettunen MI, Grohn OH, Silvennoinen MJ, Penttonen M, Kauppinen RA. Effects of intracellular pH, blood and tissue oxygen tension on T1 rho relaxation in rat brain. *Magn. Reson. Med.* 2002; **48**: 470–477.
30. Fullerton GD, Potter JL, Dornbluth NC. NMR relaxation of protons in tissues and other macromolecular water solutions. *Magn. Reson. Imaging* 1982; **1**: 209–226.
31. Petito CK. Early and late mechanisms of increased vascular permeability following experimental cerebral infarction. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1979; **38**: 222–234.
32. Pluta R, Lossinsky AS, Wisniewski HM, Mossakowski MJ. Early blood-brain barrier changes in the rat following transient complete cerebral ischemia induced by cardiac arrest. *Brain Res.* 1994; **633**: 41–52.
33. Neumann-Haefelin T, Kastrup A, de Crespigny A, Yenari MA, Ringer T, Sun GH, Moseley ME. Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage and edema formation. *Stroke* 2000; **31**: 1965–1972.
34. Schwarzbauer C, Morrissey SP, Deichmann R, Hillenbrand C, Syha J, Adolf H, Noth U, Haase A. Quantitative magnetic resonance imaging of capillary water permeability and regional blood volume with an intravascular MR contrast agent. *Magn. Reson. Med.* 1997; **37**: 769–777.
35. Symon L, Branston NM, Chikovani O. Ischemic brain edema following middle cerebral artery occlusion in baboons: relationship between regional cerebral water content and blood flow at 1 to 2 hours. *Stroke* 1979; **10**: 184–191.
36. Hatahita S, Hoff JT, Salamat SM. An osmotic gradient in ischemic brain edema. *Adv. Neurol.* 1990; **52**: 85–92.

Non invasive optical monitoring of rat brain and effects of the injection of tracers for blood flow measurements

R. Sablong,^a E. Grillon,^b O. Hugon^a and J. Derouard^{*a,b}

^aLaboratoire de Spectrométrie Physique, Université Joseph Fourier

^bLaboratoire de RMN Bioclinique, CHU Grenoble

ABSTRACT

Near infrared spectroscopy using either broad band reflectance spectrophotometry or monochromatic illumination has been carried out to monitor non invasively the changes of the concentrations of chromophores in rat brain induced by the intravenous injection of various contrast agents (indocyanine green, ultrasmall magnetic particles suspension, albumine, dextran, or saline solution alone). Depending of the wavelength and of the absorption spectrum of the injected compound the bolus can be seen either by a decrease or an increase of the transmitted light, this latter due to the induced dilution of the blood by the bolus. We suggest that this could be used to determine the arterial input function of the contrast agent needed to perform absolute cerebral blood flow imaging by nuclear magnetic resonance.

Keywords: Medical Optics and Biotechnology, Spectroscopy, tissue diagnostics, Blood/tissue constituent monitoring.

1. INTRODUCTION

Non invasive near infrared spectroscopy (NIRS) has been used to detect boluses of indocyanine green (ICG) and to estimate the cerebral blood flow (CBF) using Fick's equation¹. Similarly, hemodilution boluses were also detected in reflectance spectrophotometry on the exposed cortex². However, injected magnetic contrast agents are often used in nuclear magnetic resonance (NMR) to image cerebral blood volume and blood flow³. In this work we show that: 1. Hemodilution boluses can be detected using non invasive NIRS as well. 2. Magnetic contrast agent boluses can be detected in vivo using non invasive NIRS, either due to their intrinsic or extrinsic (after mixing with ICG) absorbency, or due to the induced hemodilution effect. This suggests the possibility to use NIRS to determine the arterial input function needed to perform CBF measurements using NMR. 3. The injection of boluses exceeding a certain volume generally induces transient blood oxygenation changes which can be monitored by NIRS.

2. METHODS

Rats are anesthetized using intraperitoneal injection. A catheter is inserted in the femoral vein for intravenous injections of various intravascular tracers. Two experimental setups have been used to monitor the attenuation of near infrared light through the brain:

2.1 Spectroscopic measurements

In the first case a broad band light source (stabilized quartz-halogen lamp) is used to illuminate the head through an optical fiber 600 μ m diameter, 0.37 numerical aperture, placed in contact with the scalp of the animal. A second, identical optical fiber placed at 6mm, collects the scattered light whose spectrum is recorded using a grating spectrometer equipped by a CCD camera. Spectra are taken every second. Sometimes the electrocardiogram (ECG) peak is used to trigger the data acquisition. The changes in the reflection spectrum are obtained by dividing the consecutive spectra, taken every second, by the spectrum taken at $t=0$. The resulting spectra are fitted to the specific absorption spectra of hemoglobins and of the injected compound (fig. 1) which yields the concentration changes of the different compounds. An example of an experimental spectrum and of its fitted spectrum is shown on Fig. 2.

*Jacques.Derouard@ujf-grenoble.fr ; phone +33 4 76 51 47 43; fax +33 4 76 51 45 44; Laboratoire de Spectrométrie Physique, Université Joseph Fourier, Grenoble 1, BP 87 38402 Saint Martin d'Hères cedex France

Some slight deviation between the experimental and fitted spectra can be seen, which could be due to the variation with the wavelength of the differential pathlength (which we have neglected here, but should be less than 5% according to Kohl et al⁴) or to the uncertainty about the specific absorption of the indocyanine green which is known to depend on the concentration and of the solvent⁵. This set-up allows us to detect the concentration changes of all the involved compounds, but it is not able to detect fast variations due to its slow acquisition time larger of about 1 second.

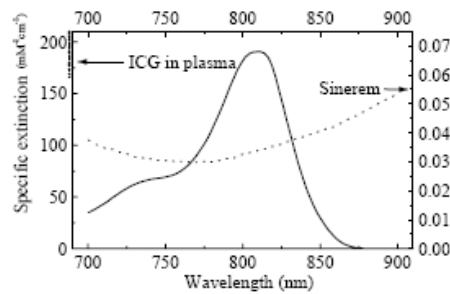


Fig. 1: Absorption spectra of some intravascular tracers used in this study. The spectrum of the indocyanine green (ICG) is taken from Landsman et al¹, in the case of low concentration dissolved in blood plasma. The absorption spectrum of Sinerem® (suspension of ultra small magnetic particles in saline solution) has been measured in our laboratory. Its absorption is much weaker than ICG at the concentrations corresponding to the normal using conditions.

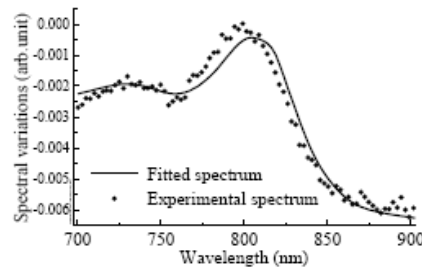


Fig. 2: Typical spectrum of the changes of the light intensity corresponding to the passage of a bolus of ICG (0.2ml concentration 0.12g/l). In the vertical scale 0.001 corresponds to 0.1% change relatively to the initial control conditions.

2.2 Single wavelength attenuation measurements

In the second setup the illuminating fiber is coupled to a laser diode emitting at 790 nm, the transmitted light through the head is collected using a 3mm diameter fiber bundle placed at about 10mm from the emitting fiber, and detected using a photomultiplier tube connected to a home made transimpedance amplifier. An adjustable analog voltage offset can be subtracted to the detection signal such that slight changes can be recorded with a good dynamic range. Data are acquired every 0.002s together with the ECG signal using a 12 bits data acquisition board. This set-up allows us to detect very fast and fairly small changes of the optical density of the tissues, but of course it cannot tell which species are involved.

3. RESULTS

3.1 Spectroscopic measurements

A typical record of the concentration changes of tissue chromophores in rat brain following the injection of ICG is shown on Fig. 3.

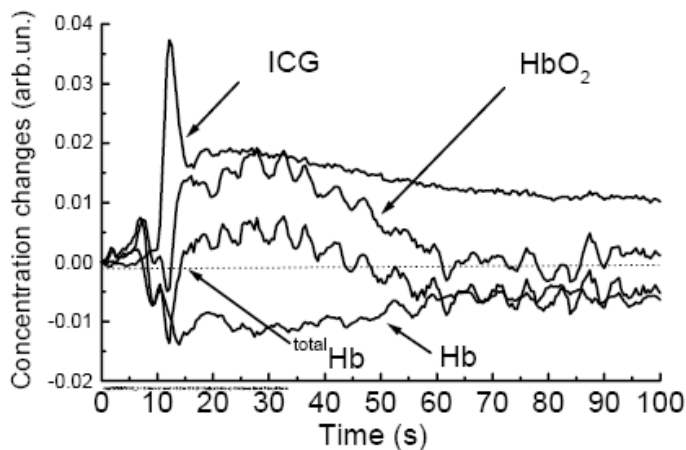


Fig. 3: Record of the concentration changes in rat brain resulting from the injection of 0.2ml of ICG (0.12g/l, in normal saline) +0.4ml normal saline at $t=5$ seconds. Spectra acquired at 1Hz, independent of the heart beating.

Many things can be seen on this record:

1. The bolus of ICG appears very clearly about 5 seconds after the injection (delay corresponding to the transit from the femoral vein to the heart, the lungs, the heart, then to the brain). While the second passage can hardly be seen as a slight hump after the main bolus, we see the clearance of the dye with a time constant of a few minutes, as expected (it is excreted to the bile).
2. During the passage of the ICG we see a decrease of the concentrations of hemoglobins, which can be interpreted as a dilution effect. This suggests that dilution boluses can be obtained by the injection of saline solution alone and could be detected non invasively as well.
3. The injection process has some severe side effects:
 - just after the injection, and before the bolus appears in the brain, a hemodynamic response can be seen as an increase of the oxyhemoglobin concentration (but the deoxyhemoglobin remains unchanged at this stage), which suggests a vasodilation of the arteria.
 - Subsequent to this we observe a very significant increase of the blood oxygen saturation level (increase of oxyhemoglobin, decrease of deoxyhemoglobin) which lasts about 1 minute. Actually the total injected volume was in this case 0.6ml which is fairly large for a rat weighting about 300g. We have found empirically that these effects were hardly observed for injected volume smaller than 0.4ml.
4. We note also some periodic oscillations in the (oxy)hemoglobin concentration. Several causes could be responsible for this, but it is difficult to give a definitive conclusion since the actual period of the phenomenon cannot be known: because of the low frequency of the data acquisition (1Hz) some stroboscopic effects could appear with the heart beating (~6Hz) and the respiration (~1-2Hz). We have frequently observed this phenomenon, even when the data acquisition is triggered by the ECG signal.

Another example of bolus detected using our optical spectroscopic device is shown on Fig. 4. In this case we wanted to see if an optical method could be used to track the input of a magnetic tracer, used for NMR imaging of cerebral blood flow or volume. Here ultra small magnetic particles (Sinerem®) dispersed in saline solution have been injected. Because this compound slightly absorbs in the visible and the near infra-red range its passage can be directly detected. Contrary to the bolus of ICG shown on Fig. 3, we see that this tracer is not excreted rapidly. Like with ICG the passage of the tracer is accompanied by a hemodilution bolus which has a similar same time course, thus it could be used to

detect the passage of any transparent contrast agent. To facilitate the optical detection of such a transparent or weakly absorbing contrast agent we suggest to incorporate some ICG in the sample: we have checked that the injection of such a sample (ICG+ Sinerem®) yields to a time course of both compounds detected in the brain which is exactly the same, as expected (Of course this is true for times shorter than the excretion time of ICG).

Like in Fig. 3 note again the oscillations in hemoglobins concentration. However there is no large hemodynamic response, note that the injected volume is smaller in this case.

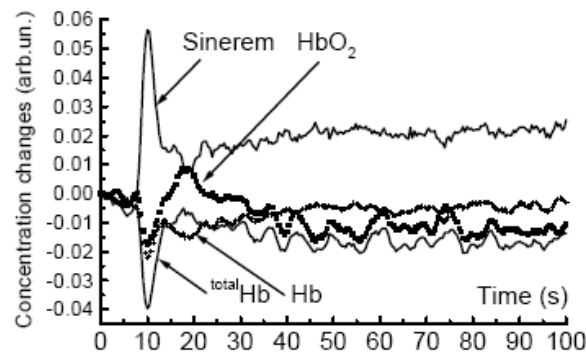


Fig. 4: Record of the concentration changes in rat brain resulting from the intravenous injection of a magnetic contrast agent (Sinerem®), 0.4ml, 200 μ mole/l. Data acquisition 1Hz.

3.2 Single wavelength attenuation measurements

The detection of a purely hemodilution bolus using our simplest apparatus (1 diode laser + photomultiplier tube) can be seen on Fig. 5. Note that the injection of the saline solution induces an *increase* of the detected light intensity. Because the detection is very fast (in this case we can resolve the oscillations with two components which corresponds to the heart beating and the respiratory rhythms, respectively as studied by Scholtz et al⁶).

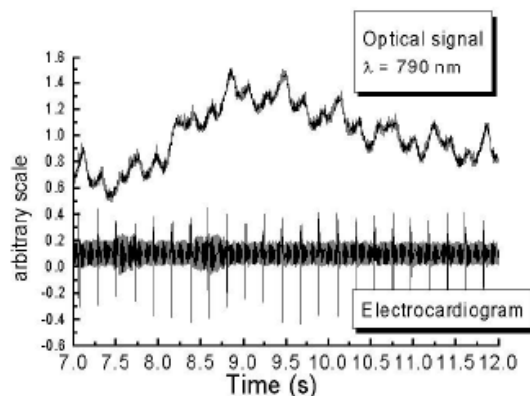


Fig. 5 Change of the intensity of light at 790nm transmitted in rat head after the intravenous injection of normal saline solution (0.2ml). Distance between the optodes 20mm. Data acquisition 250Hz.

Fig. 6 shows the same type of record after the injection of ICG. In this case we observe a decrease of the optical signal due to the increased absorption of the tissues due to the dye. The two modulations corresponding to heart beating and respiration are especially visible in this case, although the rat has been immobilized in a stereotaxic frame to prevent any motion artifact. Fig. 7 shows that it is easy to get rid of these modulations using a low pass filter to recover the pure bolus signal. The spectrum of the optical and ECG signals are shown also on Fig. 7. The spectrum of the optical signal includes the respiratory rhythm (~1Hz in this case) and its harmonics, together with the heart beating frequency (~6Hz). Because the lines are so sharp it should be easy to do a numerical filtering with notch filters instead of low pass filtering. The ECG spectrum shows also clearly that the heart beating frequency is modulated by the respiratory rhythm.

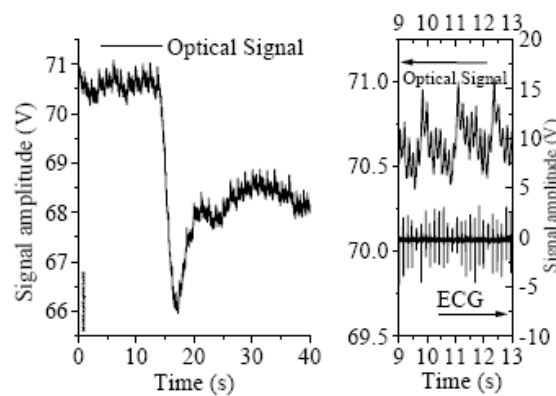


Fig. 6: Change of the intensity of light at 790nm transmitted in rat head after the intravenous injection of 0.2ml of saline solution of ICG (0.12g/l). The rat is immobilized in a stereotaxic frame. Distance between the optodes 20mm. Data acquisition 250Hz.

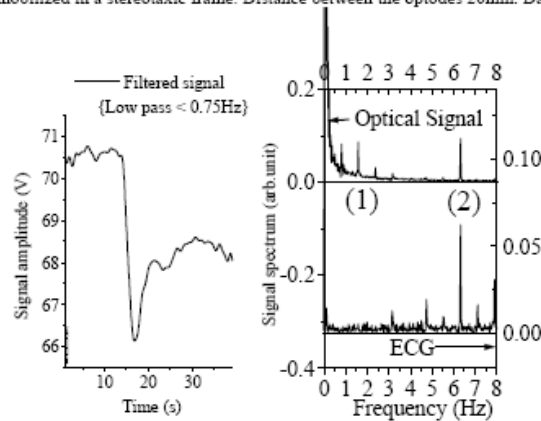


Fig. 7: Same record as Fig. 5 with low pass filtering. Spectrum of the optical and ECG signals. (1) denote the Fourier components corresponding to respiration, (2) denotes the heart beating fundamental Fourier component.

5 CONCLUSION

We have shown that non invasive NIRS can be used to detect the passage in rat head of various intravascular tracers, even if they are transparent.

A large signal to noise ratio with fast data acquisition can be achieved, which allows to observe several hemodynamic oscillations. It is tempting to attribute the oscillations at the heart beating frequency to arterial vasodilation motion. Thus a careful spectral analysis of both optical and ECG signals followed by an appropriate filtering of the optical signal could provide a signal specific to the arterial compartment from which the arterial input function of the injected intravascular tracer could be extracted. This information is needed for quantitative imaging of CBV using NMR techniques.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by "ACI Télémedecine et Technologies pour la santé", CNRS and INSERM. We would like to thank S. Rochat for technical support in building the electronic detection system, and M. Décorps for suggestions and encouragements.

6. REFERENCES

1. W.M. Kueller et al, "Non invasive measurement of regional cerebral blood flow by near infrared spectroscopy and indocyanine green", *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 445-456 (1998)
2. R.P. Shockley and J.C. LaManna "Determination of rat cerebral cortical blood volume changes by capillary mean transit time analysis during hypoxia, hypercapnia and hyperventilation", *Brain Res.* **454**, pp. 170-178, 1988
3. L. Ostergaard et al, "High resolution measurement of cerebral blood flow using intravascular tracer bolus passages", *Magn. Reson. Med.* **36**, 715-736 (1996)
4. M. Kohl, U. Lindauer, U. Dirnagl and A. Villringer, "Separation of changes in light scattering and chromophore concentrations during cortical spreading depression in rats", *Opt. Lett.* **23**, 555-557 (1998)
5. M.L.J. Landsman, G. Kwant, G.A. Mook and W.G. Zijlstra, "Light absorbing properties, stability and spectral stabilization of indocyanine green", *J. Appl. Physiol.* **40**, 575-583 (1976)
6. U.J. Sholtz et al, "Multivariate spectral analysis of the beat to beat sampled cortical NIRS signals and the heart rate variability", *Proc. SPIE* **3566**, 106-111 (1998)

Bibliographie.

- 1- ANAES (2002) Imagerie de l'accident vasculaire cérébral aigu. *Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé*.
- 2- Abbott N J (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200: 629-638
- 3- Abraham H, Somogyvari-Vigh A, Maderdrut J L, Vigh S, Arimura A (2002) Filament size influences temperature changes and brain damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Exp Brain Res* 142: 131-138
- 4- Adcock L M, Wafelman L S, Hegemier S, Moise A A, Speer M E, Contant C F, Goddard-Finegold J (1999) Neonatal intensive care applications of near-infrared spectroscopy. *Clin Perinatol* 26: 893-903
- 5- Adembri C, Venturi L, Tani A, Chiarugi A, Gramigni E, Cozzi A, Pancani T, De Gaudio R A, Pellegrini-Giampietro D E (2006) Neuroprotective effects of propofol in models of cerebral ischemia: inhibition of mitochondrial swelling as a possible mechanism. *Anesthesiology* 104: 80-89
- 6- Albayrak S, Zhao Q, Siesjo B K, Smith M L (1997) Effect of transient focal ischemia on blood-brain barrier permeability in the rat: correlation to cell injury. *Acta Neuropathol (Berl)* 94: 158-163
- 7- Amakawa K, Adachi N, Liu K, Ikemune K, Fujitani T, Arai T (1996) Effects of pre- and postischemic administration of thiopental on transmitter amino acid release and histologic outcome in gerbils. *Anesthesiology* 85: 1422-1430
- 8- Aoki I, Naruse S, Tanaka C (2004) Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of brain activity and applications to early detection of brain ischemia. *NMR Biomed* 17: 569-580
- 9- Ashwal S, Tone B, Tian H R, Cole D J, Pearce W J (1998) Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 29: 1037-46
- 10- Asplund K, Bonita R, Kuulasmaa K, Rajakangas A M, Schaedlich H, Suzuki K, Thorvaldsen P, Tuomilehto J (1995) Multinational comparisons of stroke epidemiology. Evaluation of case ascertainment in the WHO MONICA Stroke Study. World Health Organization Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease. *Stroke* 26: 355-360
- 11- Astrup J, Siesjo B K, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12: 723-725
- 12- Astrup J, Symon L, Branston N M, Lassen N A (1977) Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8: 51-57
- 13- Ayata C, Ropper A H (2002) Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci* 9: 113-124
- 14- Back T (1998) Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol* 18: 621-638
- 15- Back T, Hemmen T, Schuler O G (2004) Lesion evolution in cerebral ischemia. *J Neurol* 251: 388-397
- 16- Back T, Zhao W, Ginsberg M D (1995) Three-dimensional image analysis of brain glucose metabolism-blood flow uncoupling and its electrophysiological correlates in the acute ischemic penumbra following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 566-577
- 17- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16: 1-13

- 18- Barber P A, Hoyte L, Kirk D, Foniok T, Buchan A, Tuor U (2005) Early T1- and T2-weighted MRI signatures of transient and permanent middle cerebral artery occlusion in a murine stroke model studied at 9.4T. *Neurosci Lett* 388: 54-59
- 19- Barbier E L, Liu L, Grillon E, Payen J F, Lebas J F, Segebarth C, Remy C (2005) Focal brain ischemia in rat: acute changes in brain tissue T(1) reflect acute increase in brain tissue water content. *NMR Biomed* 18: 499-506
- 20- Barbier E L, St Lawrence K S, Grillon E, Koretsky A P, Decorps M (2002) A model of blood-brain barrier permeability to water: accounting for blood inflow and longitudinal relaxation effects. *Magn Reson Med* 47: 1100-1109
- 21- Bardutzky J, Meng X, Bouley J, Duong T Q, Ratan R, Fisher M (2005) Effects of intravenous dimethyl sulfoxide on ischemia evolution in a rat permanent occlusion model. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 968-977
- 22- Bazin J E (1997) [Effects of anesthetic agents on intracranial pressure]. *Ann Fr Anesth Reanim* 16: 445-452
- 23- Beirne J P, Pearlstein R D, Massey G W, Warner D S (1998) Effect of halothane in cortical cell cultures exposed to N-methyl-D-aspartate. *Neurochem Res* 23: 17-23
- 24- Belayev L, Alonso O F, Busto R, Zhao W, Ginsberg M D (1996) Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 27: 1616-22
- 25- Belayev L, Busto R, Zhao W, Fernandez G, Ginsberg M D (1999) Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res* 833: 181-190
- 26- Bernard J M, Wouters P F, Doursout M F, Florence B, Chelly J E, Merin R G (1990) Effects of sevoflurane and isoflurane on cardiac and coronary dynamics in chronically instrumented dogs. *Anesthesiology* 72: 659-662
- 27- Bhardwaj A, Castro III A F, Alkayed N J, Hurn P D, Kirsch J R (2001) Anesthetic choice of halothane versus propofol: impact on experimental perioperative stroke. *Stroke* 32: 1920-1925
- 28- Boisset S, Steghens J, Favetta P, Terreux R, Guillon J (2004) Relative antioxidant capacities of propofol and its main metabolites. *Arch Toxicol* 78: 635-642
- 29- Bousser M G (2002) Accidents vasculaires cérébraux. Agence régionale de l'hospitalisation d'Ile de France.
- 30- Brain Resuscitation Clinical Trial I Study Group (1986) Randomized clinical study of thiopental loading in comatose survivors of cardiac arrest. *N Engl J Med* 314: 397-403
- 31- Browning J L, Heizer M L, Widmayer M A, Baskin D S (1997) Effects of halothane, alpha-chloralose, and pCO₂ on injury volume and CSF beta-endorphin levels in focal cerebral ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 31: 29-42
- 32- Busto R, Dietrich W D, Globus M Y, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg M D (1987) Small differences in intrischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 7: 729-738

- 33- Butcher K S, Parsons M, MacGregor L, Barber P A, Chalk J, Bladin C, Levi C, Kimber T, Schultz D, Fink J, Tress B, Donnan G, Davis S (2005) Refining the perfusion-diffusion mismatch hypothesis. *Stroke* 36: 1153-1159
- 34- CAST (Chinese Acute Stroke Trial) Collaborative Group (1997) CAST: randomised placebo-controlled trial of early aspirin use in 20,000 patients with acute ischaemic stroke.. *Lancet* 349: 1641-1649
- 35- CHERRICK G R, STEIN S W, LEEVY C M, DAVIDSON C S (1960) Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest* 39: 592-600
- 36- Chan P H (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124-1129
- 37- Chan P H, Kinouchi H, Epstein C J, Carlson E, Chen S F, Imaizumi S, Yang G Y (1993) Role of superoxide dismutase in ischemic brain injury: reduction of edema and infarction in transgenic mice following focal cerebral ischemia. *Prog Brain Res* 96: 97-104
- 38- Chapon C, Lemaire L, Franconi F, Marescaux L, Legras P, Denizot B, Le Jeune J J (2004) Assessment of myocardial viability in rats: Evaluation of a new method using superparamagnetic iron oxide nanoparticles and Gd-DOTA at high magnetic field. *Magn Reson Med* 52: 932-936
- 39- Chileuitt L, Leber K, McCalden T, Weinstein P R (1996) Induced hypertension during ischemia reduces infarct area after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. *Surg Neurol* 46: 229-234
- 40- Cipolla M J, Crete R, Vitullo L, Rix R D (2004) Transcellular transport as a mechanism of blood-brain barrier disruption during stroke. *Front Biosci* 9: 777-785
- 41- Clark W M, Wissman S, Albers G W, Jhamandas J H, Madden K P, Hamilton S (1999) Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA* 282: 2019-2026
- 42- Cole D J, Cross L M, Drummond J C, Patel P M, Jacobsen W K (2001) Thiopentone and methohexital, but not pentobarbitone, reduce early focal cerebral ischemic injury in rats. *Can J Anaesth* 48: 807-814
- 43- Copin J C, Gasche Y (2003) [Morphology and physiology of the blood-brain barrier]. *Ann Fr Anesth Reanim* 22: 202-214
- 44- Crossgrove J S, Allen D D, Bukaveckas B L, Rhineheimer S S, Yokel R A (2003) Manganese distribution across the blood-brain barrier. I. Evidence for carrier-mediated influx of manganese citrate as well as manganese and manganese transferrin. *Neurotoxicology* 24: 3-13
- 45- Cunningham L A, Wetzel M, Rosenberg G A (2005) Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia* 50: 329-339
- 46- Davis S (2006) Optimising Clinical Trial Design for Proof of Neuroprotection in Acute Ischaemic Stroke: The SAINT Clinical Trial Programme. *Cerebrovasc Dis* 22 Suppl 1: 18-24
- 47- De Georgia M A, Krieger D W, Abou-Chebl A, Devlin T G, Jauss M, Davis S M, Koroshetz W J, Rordorf G, Warach S (2004) Cooling for Acute Ischemic Brain Damage (COOL AID): a feasibility trial of endovascular cooling. *Neurology* 63: 312-317

- 48- De La Cruz J P, Villalobos M A, Sedeno G, Sanchez De La Cuesta F (1998) Effect of propofol on oxidative stress in an in vitro model of anoxia-reoxygenation in the rat brain. *Brain Res* 800: 136-144
- 49- DeBow S, Colbourne F (2003) Brain temperature measurement and regulation in awake and freely moving rodents. *Methods* 30: 167-171
- 50- Di Carlo A, Launer L J, Breteler M M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Schmidt R, Hofman A (2000) Frequency of stroke in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. ILSA Working Group and the Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology* 54: S28-33
- 51- Dijkhuizen R M, Beekwilder J P, van der Worp H B, Berkelbach van der Sprenkel J W, Tulleken K A, Nicolay K (1999) Correlation between tissue depolarizations and damage in focal ischemic rat brain. *Brain Res* 840: 194-205
- 52- Dijkhuizen R M, Knollema S, van der Worp H B, Ter Horst G J, De Wildt D J, Berkelbach van der Sprenkel J W, Tulleken K A, Nicolay K (1998) Dynamics of cerebral tissue injury and perfusion after temporary hypoxia-ischemia in the rat: evidence for region-specific sensitivity and delayed damage. *Stroke* 29: 695-704
- 53- Ding D, Moskowitz S I, Li R, Lee S B, Esteban M, Tomaselli K, Chan J, Bergold P J (2000) Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol* 162: 1-12
- 54- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz M A (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391-397
- 55- Dittmar M, Spruss T, Schuierer G, Horn M (2003) External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 34: 2252-2257
- 56- Dronne M, Boissel J, Grenier E, Gilquin H, Cucherat M, Hommel M, Barbier E, Bricca G (2004) Mathematical modelling of an ischemic stroke: an integrative approach. *Acta Biotheor* 52: 255-272
- 57- Drummond J C, Cole D J, Patel P M, Reynolds L W (1995) Focal cerebral ischemia during anesthesia with etomidate, isoflurane, or thiopental: a comparison of the extent of cerebral injury. *Neurosurgery* 37: 742-8
- 58- Duval V, Chabaud S, Girard P, Cucherat M, Hommel M, Boissel J (2002) Physiologically based model of acute ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 1010-1018
- 59- Engelhard K, Werner C, Hoffman W E, Matthes B, Blobner M, Kochs E (2003) The effect of sevoflurane and propofol on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats. *Anesth Analg* 97: 1155-61
- 60- Engelhard K, Werner C, Reeker W, Lu H, Mollenberg O, Mielke L, Kochs E (1999) Desflurane and isoflurane improve neurological outcome after incomplete cerebral ischaemia in rats. *Br J Anaesth* 83: 415-421
- 61- Engelhorn T, von Kummer R, Reith W, Forsting M, Doerfler A (2002) What is effective in malignant middle cerebral artery infarction: reperfusion, craniectomy, or both? An experimental study in rats. *Stroke* 33: 617-622

- 62- Ergun R, Akdemir G, Sen S, Tasci A, Ergungor F (2002) Neuroprotective effects of propofol following global cerebral ischemia in rats. *Neurosurg Rev* 25: 95-98
- 63- Ewing J R, Jiang Q, Boska M, Zhang Z G, Brown S L, Li G H, Divine G W, Chopp M (1999) T1 and magnetization transfer at 7 Tesla in acute ischemic infarct in the rat. *Magn Reson Med* 41: 696-705
- 64- Fatahzadeh M, Glick M (2006) Stroke: epidemiology, classification, risk factors, complications, diagnosis, prevention, and medical and dental management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102: 180-191
- 65- Feiner J R, Bickler P E, Estrada S, Donohoe P H, Fahlman C S, Schuyler J A (2005) Mild hypothermia, but not propofol, is neuroprotective in organotypic hippocampal cultures. *Anesth Analg* 100: 215-225
- 66- Fenart L, Casanova A, Dehouck B, Duhem C, Slupek S, Cecchelli R, Betbeder D (1999) Evaluation of effect of charge and lipid coating on ability of 60-nm nanoparticles to cross an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 1017-1022
- 67- Fiebich J B, Jansen O, Schellinger P D, Heiland S, Hacke W, Sartor K (2002) Serial analysis of the apparent diffusion coefficient time course in human stroke. *Neuroradiology* 44: 294-298
- 68- Fox G, Gallacher D, Shevde S, Loftus J, Swayne G (1993) Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat. *Stroke* 24: 2087-92
- 69- Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan P H (1999) Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res* 842: 92-100
- 70- Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M, Ahuja A, Callahan F, Clark W M, Silver F, Rivera F (1999) Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *JAMA* 282: 2003-2011
- 71- Garcia J H, Lassen N A, Weiller C, Sperling B, Nakagawara J (1996) Ischemic stroke and incomplete infarction. *Stroke* 27: 761-765
- 72- Garcia J H, Liu K F, Ye Z R, Gutierrez J A (1997) Incomplete infarct and delayed neuronal death after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 28: 2303-9
- 73- Garcia J H, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang Z G, Lian J, Chen S, Chopp M (1993) Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 142: 623-635
- 74- Gartshore G, Patterson J, Macrae I M (1997) Influence of ischemia and reperfusion on the course of brain tissue swelling and blood-brain barrier permeability in a rodent model of transient focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 147: 353-360
- 75- Gasche Y, Copin J (2003) [Blood-brain barrier pathophysiology and ischaemic brain oedema]. *Ann Fr Anesth Reanim* 22: 312-319
- 76- Gelb A W, Bayona N A, Wilson J X, Cechetto D F (2002) Propofol anesthesia compared to awake reduces infarct size in rats. *Anesthesiology* 96: 1183-1190

- 77- Gidday J M (2006) Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* 7: 437-448
- 78- Ginsberg M D, Busto R (1998) Combating hyperthermia in acute stroke: a significant clinical concern. *Stroke* 29: 529-534
- 79- Haase A (1990) Snapshot FLASH MRI. Applications to T1, T2, and chemical-shift imaging. *Magn Reson Med* 13: 77-89
- 80- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne M H (1995) Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 274: 1017-1025
- 81- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donnan G, Schneider D, Diez-Tejedor E, Trouillas P (1998) Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 352: 1245-1251
- 82- Haelewyn B, Yvon A, Hanouz J, MacKenzie E, Ducouret P, Gerard J, Roussel S (2003) Desflurane affords greater protection than halothane against focal cerebral ischaemia in the rat. *Br J Anaesth* 91: 390-396
- 83- Hakim A (1999) [Physiology and pathology of cerebral ischemia]. *Rev Neurol (Paris)* 155: 631-637
- 84- Hankey G J, Warlow C P (1999) Treatment and secondary prevention of stroke: evidence, costs, and effects on individuals and populations. *Lancet* 354: 1457-1463
- 85- Hansen T, Warner D, Todd M, Vust L, Trawick D (1988) Distribution of cerebral blood flow during halothane versus isoflurane anesthesia in rats. *Anesthesiology* 69: 332-337
- 86- Hara H, Huang P L, Panahian N, Fishman M C, Moskowitz M A (1996) Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 605-611
- 87- Harada H, Kelly P J, Cole D J, Drummond J C, Patel P M (1999) Isoflurane reduces N-methyl-D-aspartate toxicity in vivo in the rat cerebral cortex. *Anesth Analg* 89: 1442-1447
- 88- Harris N G, Gauden V, Fraser P A, Williams S R, Parker G J (2002) MRI measurement of blood-brain barrier permeability following spontaneous reperfusion in the starch microsphere model of ischemia. *Magn Reson Imaging* 20: 221-230
- 89- Hata R, Mies G, Wiessner C, Fritze K, Hesselbarth D, Brinker G, Hossmann K A (1998) A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: hemodynamic, biochemical, and magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 367-375
- 90- Heath K J, Gupta S, Matta B F (1997) The effects of sevoflurane on cerebral hemodynamics during propofol anesthesia. *Anesth Analg* 85: 1284-1287
- 91- Heo J H, Han S W, Lee S K (2005) Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med* 39: 51-70

- 92- Hoehn-Berlage M, Eis M, Back T, Kohno K, Yamashita K (1995) Changes of relaxation times (T1, T2) and apparent diffusion coefficient after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat: temporal evolution, regional extent, and comparison with histology. *Magn Reson Med* 34: 824-834
- 93- Hommel M, Jaillard A, Besson G (1999) [Role of emergency cerebrovascular units in the network of care]. *Rev Neurol (Paris)* 155: 666-669
- 94- Horn J, Limburg M (2001) Calcium antagonists for ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 32: 570-576
- 95- Hosomi N, Mizushige K, Kitadai M, Ohyama H, Ichihara S, Takahashi T, Matsuo H (1999) Induced hypertension treatment to improve cerebral ischemic injury after transient forebrain ischemia. *Brain Res* 835: 188-196
- 96- Hossmann K (2006) Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. *Cell Mol Neurobiol* :
- 97- Hossmann K A (1998) Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res* 39: 106-120
- 98- Huang Z, Huang P L, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman M C, Moskowitz M A (1996) Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 981-987
- 99- Huang Z, Huang P L, Panahian N, Dalkara T, Fishman M C, Moskowitz M A (1994) Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265: 1883-1885
- 100- Huber J D, Egleton R D, Davis T P (2001) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 24: 719-725
- 101- Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross M E (1997) Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci* 17: 9157-9164
- 102- Ichai C, Ciais J F, Grimaud D (1997) [The internal environment and intracranial hypertension]. *Ann Fr Anesth Reanim* 16: 435-444
- 103- International Stroke Trial Collaborative Group (1997) The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet* 349: 1569-1581
- 104- Ito H, Watanabe Y, Isshiki A, Uchino H (1999) Neuroprotective properties of propofol and midazolam, but not pentobarbital, on neuronal damage induced by forebrain ischemia, based on the GABAA receptors. *Acta Anaesthesiol Scand* 43: 153-162
- 105- Jobsis F F, Keizer J H, LaManna J C, Rosenthal M (1977) Reflectance spectrophotometry of cytochrome aa3 in vivo. *J Appl Physiol* 43: 858-872
- 106- Jones S C, Radinsky C R, Furlan A J, Chyatte D, Qu Y, Easley K A, Perez-Trepichio A D (2002) Variability in the magnitude of the cerebral blood flow response and the shape of the cerebral blood flow-pressure autoregulation curve during hypotension in normal rats [corrected]. *Anesthesiology* 97: 488-496

- 107- Kaisti K K, Langsjo J W, Aalto S, Oikonen V, Sipila H, Teras M, Hinkka S, Metsahonkala L, Scheinin H (2003) Effects of sevoflurane, propofol, and adjunct nitrous oxide on regional cerebral blood flow, oxygen consumption, and blood volume in humans. *Anesthesiology* 99: 603-613
- 108- Kapinya K J, Lowl D, Futterer C, Maurer M, Waschke K F, Isaev N K, Dirnagl U (2002) Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke* 33: 1889-1898
- 109- Kastrup A, Engelhorn T, Beaulieu C, de Crespigny A, Moseley M E (1999) Dynamics of cerebral injury, perfusion, and blood-brain barrier changes after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 166: 91-99
- 110- Katsura K, Kristian T, Smith M L, Siesjo B K (1994) Acidosis induced by hypercapnia exaggerates ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 243-250
- 111- Kawaguchi M, Drummond J C, Cole D J, Kelly P J, Spurlock M P, Patel P M (2004) Effect of isoflurane on neuronal apoptosis in rats subjected to focal cerebral ischemia. *Anesth Analg* 98: 798-805
- 112- Kawaguchi M, Kimbro J R, Drummond J C, Cole D J, Kelly P J, Patel P M (2000) Isoflurane delays but does not prevent cerebral infarction in rats subjected to focal ischemia. *Anesthesiology* 92: 1335-1342
- 113- Kettunen M I, Grohn O H, Lukkarinen J A, Vainio P, Silvennoinen M J, Kauppinen R A (2000) Interrelations of T(1) and diffusion of water in acute cerebral ischemia of the rat. *Magn Reson Med* 44: 833-839
- 114- Kety S S (1960) Measurement of local blood flow by the exchange of an inert, diffusible substance. *Methods Med Res* 8: 228-233
- 115- Kimbro J R, Kelly P J, Drummond J C, Cole D J, Patel P M (2000) Isoflurane and pentobarbital reduce AMPA toxicity in vivo in the rat cerebral cortex. *Anesthesiology* 92: 806-812
- 116- Kinouchi H, Epstein C J, Mizui T, Carlson E, Chen S F, Chan P H (1991) Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 11158-11162
- 117- Klatzo I (1967) Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 26: 1-14
- 118- Kloner R A, Jennings R B (2001) Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 104: 2981-2989
- 119- Kloss C, Thomassen N, Fesl G, Martens K, Yousri T, Hamann G (2002) Tissue-saving infarct volumetry using histochemistry validated by MRI in rat focal ischemia. *Neurol Res* 24: 713-718
- 120- Knight R A, Barker P B, Fagan S C, Li Y, Jacobs M A, Welch K M (1998) Prediction of impending hemorrhagic transformation in ischemic stroke using magnetic resonance imaging in rats. *Stroke* 29: 144-151
- 121- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G (1986) Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8: 1-8

- 122- Krieger D W, Yenari M A (2004) Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? *Stroke* 35: 1482-1489
- 123- Kuebler W M, Sckell A, Habler O, Kleen M, Kuhnle G E, Welte M, Messmer K, Goetz A E (1998) Noninvasive measurement of regional cerebral blood flow by near- infrared spectroscopy and indocyanine green. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 445-456
- 124- Kwiatkowski T G, Libman R B, Frankel M, Tilley B C, Morgenstern L B, Lu M, Broderick J P, Lewandowski C A, Marler J R, Levine S R, Brott T (1999) Effects of tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke at one year. National Institute of Neurological Disorders and Stroke Recombinant Tissue Plasminogen Activator Stroke Study Group. *N Engl J Med* 340: 1781-1787
- 125- Latour L L, Kang D W, Ezzeddine M A, Chalela J A, Warach S (2004) Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Ann Neurol* 56: 468-477
- 126- Lee J H, Silva A C, Merkle H, Koretsky A P (2005) Manganese-enhanced magnetic resonance imaging of mouse brain after systemic administration of MnCl₂: dose-dependent and temporal evolution of T1 contrast. *Magn Reson Med* 53: 640-648
- 127- Lemesle M, Milan C, Faivre J, Moreau T, Giroud M, Dumas R (1999) Incidence trends of ischemic stroke and transient ischemic attacks in a well-defined French population from 1985 through 1994. *Stroke* 30: 371-377
- 128- Lenz C, Rebel A, van Ackern K, Kuschinsky W, Waschke K F (1998) Local cerebral blood flow, local cerebral glucose utilization, and flow-metabolism coupling during sevoflurane versus isoflurane anesthesia in rats. *Anesthesiology* 89: 1480-1488
- 129- Li F, Han S, Tatlisumak T, Carano R A, Irie K, Sotak C H, Fisher M (1998) A new method to improve in-bore middle cerebral artery occlusion in rats: demonstration with diffusion- and perfusion-weighted imaging. *Stroke* 29: 1715-9
- 130- Lin B, Ginsberg M D (2000) Quantitative assessment of the normal cerebral microvasculature by endothelial barrier antigen (EBA) immunohistochemistry: application to focal cerebral ischemia. *Brain Res* 865: 237-244
- 131- Lin W, Venkatesan R, Gurleyik K, He Y Y, Powers W J, Hsu C Y (2000) An absolute measurement of brain water content using magnetic resonance imaging in two focal cerebral ischemic rat models. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 37-44
- 132- Lo E H, Pan Y, Matsumoto K, Kowall N W (1994) Blood-brain barrier disruption in experimental focal ischemia: comparison between in vivo MRI and immunocytochemistry. *Magn Reson Imaging* 12: 403-411
- 133- Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91
- 134- Lorberboym M, Lampl Y, Sadeh M (2003) Correlation of 99mTc-DTPA SPECT of the blood-brain barrier with neurologic outcome after acute stroke. *J Nucl Med* 44: 1898-1904
- 135- Lundbom N M, Manner T, Komu M, Peltola O, Leino K A, Kirvela O A (1999) Barbiturate anesthesia and brain proton spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol* 20: 1543-1546

- 136- Luo Q M, Zheng S Q, Yang Y, Guan L C, Chance B (1999) Monitoring of mental work with functional near-infrared imager. *J Cereb Blood Flow Metab* 19 (Suppl. 1): S405
- 137- Luo Q M, Zheng S, Chance B, Nioka S (1998) Real time functional near-infrared imager. *Proceedings of SPIE* 3548: 109-113
- 138- Lythgoe M F, Thomas D L, Calamante F, Pell G S, King M D, Busza A L, Sotak C H, Williams S R, Ordidge R J, Gadian D G (2000) Acute changes in MRI diffusion, perfusion, T(1), and T(2) in a rat model of oligemia produced by partial occlusion of the middle cerebral artery. *Magn Reson Med* 44: 706-712
- 139- Mackensen G B, Nellgard B, Kudo M, Sheng H, Pearlstein R D, Warner D S (2000) Periischemic cerebral blood flow (CBF) does not explain beneficial effects of isoflurane on outcome from near-complete forebrain ischemia in rats. *Anesthesiology* 93: 1102-1106
- 140- Mackensen G B, Nellgard B, Miura Y, Chu C T, Dexter F, Pearlstein R D, Warner D S (1999) Sympathetic ganglionic blockade masks beneficial effect of isoflurane on histologic outcome from near-complete forebrain ischemia in the rat. *Anesthesiology* 90: 873-881
- 141- Madsen P L, Secher N H (1999) Near-infrared oximetry of the brain. *Prog Neurobiol* 58: 541-560
- 142- Maekawa T, Tommasino C, Shapiro H M, Keifer-Goodman J, Kohlenberger R W (1986) Local cerebral blood flow and glucose utilization during isoflurane anesthesia in the rat. *Anesthesiology* 65: 144-151
- 143- Marler J R. (1995) The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. . *N Engl J Med* 333: 1581-1587
- 144- Marmarou A, Tanaka K, Shulman K (1982) An improved gravimetric measure of cerebral edema. *J Neurosurg* 56: 246-253
- 145- Martin A, Rojas S, Chamorro A, Falcon C, Bargallo N, Planas A M (2006) Why does acute hyperglycemia worsen the outcome of transient focal cerebral ischemia? Role of corticosteroids, inflammation, and protein O-glycosylation. *Stroke* 37: 1288-1295
- 146- Martinez-Vila E, Irimia P (2005) Challenges of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke treatment. *Cerebrovasc Dis* 20 Suppl 2: 148-158
- 147- Mas J L, Amah G, Abdelmoumene N (2002) Prise en charge initiale des patients adultes atteints d'accident vasculaire cérébrale - aspects médicaux.
- 148- Matta B F, Heath K J, Tipping K, Summors A C (1999) Direct cerebral vasodilatory effects of sevoflurane and isoflurane. *Anesthesiology* 91: 677-680
- 149- Mayhan W G, Didion S P (1996) Glutamate-induced disruption of the blood-brain barrier in rats. Role of nitric oxide. *Stroke* 27: 965-9
- 150- Mayhan W G, Heistad D D (1985) Permeability of blood-brain barrier to various sized molecules. *Am J Physiol* 248: H712-8
- 151- Meek J H, Elwell C E, Khan M J, Romaya J, Wyatt J S, Delpy D T, Zeki S (1995) Regional changes in cerebral haemodynamics as a result of a visual stimulus measured by near infrared spectroscopy. *Proc Biol Sci* 261: 351-356

- 152- Miao N, Nagao K, Lynch C 3 (1998) Thiopental and methohexital depress Ca^{2+} entry into and glutamate release from cultured neurons. *Anesthesiology* 88: 1643-1653
- 153- Nagashima H, Okudera H, Kobayashi S, Iwashita T (1998) Monitoring of cerebral hemodynamics using near-infrared spectroscopy during local intraarterial thrombolysis: case report. *Surg Neurol* 49: 420-424
- 154- Nasu I, Yokoo N, Takaoka S, Takata K, Hoshikawa T, Okada M, Miura Y (2006) The dose-dependent effects of isoflurane on outcome from severe forebrain ischemia in the rat. *Anesth Analg* 103: 413-8
- 155- National Center for Health Statistics. Health, United States, 2005 With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, Maryland: 2005: U.S. Government Printing Office Washington, DC 20402, 2006.
- 156- Neumann-Haefelin C, Brinker G, Uhlenkuken U, Pillekamp F, Hossmann K, Hoehn M (2002) Prediction of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy of clot embolism: an MRI investigation in rat brain. *Stroke* 33: 1392-1398
- 157- Neumann-Haefelin T, Kastrup A, de Crespigny A, Yenari M A, Ringer T, Sun G H, Moseley M E (2000) Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage, and edema formation. *Stroke* 31: 1965-1972
- 158- Neumann-Haefelin T, Wittsack H J, Wenserski F, Siebler M, Seitz R J, Modder U, Freund H J (1999) Diffusion- and perfusion-weighted MRI. The DWI/PWI mismatch region in acute stroke. *Stroke* 30: 1591-1597
- 159- Neumar R W (2000) Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med* 36: 483-506
- 160- Oliff H S, Weber E, Miyazaki B, Marek P (1995) Infarct volume varies with rat strain and vendor in focal cerebral ischemia induced by transcranial middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 699: 329-331
- 161- Olsen T S, Weber U J, Kammergaard L P (2003) Therapeutic hypothermia for acute stroke. *Lancet Neurol* 2: 410-416
- 162- Owen-Reece H, Smith M, Elwell C E, Goldstone J C (1999) Near infrared spectroscopy. *Br J Anaesth* 82: 418-426
- 163- Pape M, Engelhard K, Eberspacher E, Hollweck R, Kellermann K, Zintner S, Hutzler P, Werner C (2006) The long-term effect of sevoflurane on neuronal cell damage and expression of apoptotic factors after cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth Analg* 103: 173-9
- 164- Patel P M, Drummond J C, Cole D J, Kelly P J, Watson M (1998) Isoflurane and pentobarbital reduce the frequency of transient ischemic depolarizations during focal ischemia in rats. *Anesth Analg* 86: 773-780
- 165- Paxinos G (1995) The Rat Nervous System. Academic Press Australia
- 166- Paxinos G, Watson C (1998) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Fourth Edition. Academic Press Australia

- 167- Payen J F, Fauvage B, Falcon D, Lavagne P (2003) [Brain oedema following blood-brain barrier disruption: mechanisms and diagnosis]. *Ann Fr Anesth Reanim* 22: 220-225
- 168- Petit C K (1979) Early and late mechanisms of increased vascular permeability following experimental cerebral infarction. *J Neuropathol Exp Neurol* 38: 222-234
- 169- Petty M A, Wettstein J G (2001) Elements of cerebral microvascular ischaemia. *Brain Res Brain Res Rev* 36: 23-34
- 170- Pfefferkorn T, Rosenberg G A (2003) Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 34: 2025-2030
- 171- Pinard E, Engrand N (1999) [Physiopathology of cerebral ischemia]. *Ann Fr Anesth Reanim* 18: 574-582
- 172- Pittman J E, Sheng H, Pearlstein R, Brinkhous A, Dexter F, Warner D S (1997) Comparison of the effects of propofol and pentobarbital on neurologic outcome and cerebral infarct size after temporary focal ischemia in the rat. *Anesthesiology* 87: 1139-1144
- 173- Pluta R, Lossinsky A S, Wisniewski H M, Mossakowski M J (1994) Early blood-brain barrier changes in the rat following transient complete cerebral ischemia induced by cardiac arrest. *Brain Res* 633: 41-52
- 174- Preston E, Webster J (2002) Differential passage of [14C]sucrose and [3H]inulin across rat blood- brain barrier after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 103: 237-242
- 175- Ren Y, Hashimoto M, Pulsinelli W A, Nowak T S J (2004) Hypothermic protection in rat focal ischemia models: strain differences and relevance to "reperfusion injury". *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 42-53
- 176- Riefke B, Licha K, Semmler D, Nolte D, Ebert B, Rinneberg H (1997) In vivo characterization of cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging. *Proceedings of SPIE* 2927: 199-208
- 177- Roach G W, Newman M F, Murkin J M, Martzke J, Ruskin A, Li J, Guo A, Wisniewski A, Mangano D T (1999) Ineffectiveness of burst suppression therapy in mitigating perioperative cerebrovascular dysfunction. Multicenter Study of Perioperative Ischemia (McSPI) Research Group. *Anesthesiology* 90: 1255-1264
- 178- Rosenberg G A (1999) Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis* 42: 209-216
- 179- Rudin M, Sauter A (1989) Non-invasive determination of cerebral blood flow changes by 19F NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 2: 98-103
- 180- Ruta T S, Drummond J C, Cole D J (1993) The effect of acute hypocapnia on local cerebral blood flow during middle cerebral artery occlusion in isoflurane anesthetized rats. *Anesthesiology* 78: 134-140
- 181- Sa de Camargo E C, Koroshetz W J (2005) Neuroimaging of ischemia and infarction. *NeuroRx* 2: 265-276
- 182- Sablong R (2002) Méthodes optiques pour l'exploration fonctionnelle du cerveau. *Thèse de l'Université Joseph Fourier - GRENOBLE*.

- 183- Sakurada O, Kennedy C, Jehle J, Brown J D, Carbin G L, Sokoloff L (1978) Measurement of local cerebral blood flow with iodo [14C] antipyrine. *Am J Physiol* 234: H59-66
- 184- Salines E, de Peretti C (2006) L'état de santé de la population en France en 2006 - Indicateurs associés à la loi relative à la politique de santé publique.
- 185- Samson Y, Lapergue B, Hosseini H (2005) [Inflammation and ischaemic stroke: current status and future perspectives]. *Rev Neurol (Paris)* 161: 1177-1182
- 186- Sappino A P, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss J Z, Wohlwend A, Vassalli J D (1993) Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest* 92: 679-685
- 187- Saver J L (2006) Time is brain--quantified. *Stroke* 37: 263-266
- 188- Schaller B, Graf R (2003) Hypothermia and stroke: the pathophysiological background. *Pathophysiology* 10: 7-35
- 189- Schmid-Elsaesser R, Schroder M, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H J (1999) EEG burst suppression is not necessary for maximum barbiturate protection in transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Neurol Sci* 162: 14-19
- 190- Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H J (1998) 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* 29: 2162-2170
- 191- Schmidt R, Breteler M M, Inzitari D, Fratiglioni L, Hofman A, Launer L J (2000) Prognosis with stroke in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54: S34-7
- 192- Schriger D L, Kalafut M, Starkman S, Krueger M, Saver J L (1998) Cranial computed tomography interpretation in acute stroke: physician accuracy in determining eligibility for thrombolytic therapy. *JAMA* 279: 1293-1297
- 193- Seegers H (1999) Ischémie cérébrale focale chez le rat: approche multiparamétrique. Etude cellulaire et imagerie par RMN de diffusion et de perfusion (volume sanguin cérébral). *Université Joseph Fourier - Grenoble*.
- 194- Sehara Y, Hayashi T, Deguchi K, Nagotani S, Zhang H, Shoji M, Abe K (2006) Distribution of inducible nitric oxide synthase and cell proliferation in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* :
- 195- Shibuta S, Kosaka J, Mashimo T, Fukuda Y, Yoshiya I (1998) Nitric oxide-induced cytotoxicity attenuation by thiopentone sodium but not pentobarbitone sodium in primary brain cultures. *Br J Pharmacol* 124: 804-810
- 196- Siegal G J, Agranoff B W, Albers R W et al. (1999) Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects 6th ed. Lippincott, Williams & Wilkins
- 197- Silva A C, Lee J H, Aoki I, Koretsky A P (2004) Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI): methodological and practical considerations. *NMR Biomed* 17: 532-543
- 198- Silvennoinen M J, Kettunen M I, Kauppinen R A (2003) Effects of hematocrit and oxygen saturation level on blood spin-lattice relaxation. *Magn Reson Med* 49: 568-571

- 199- Sitar S M, Hanifi-Moghaddam P, Gelb A, Cechetto D F, Siushansian R, Wilson J X (1999) Propofol prevents peroxide-induced inhibition of glutamate transport in cultured astrocytes. *Anesthesiology* 90: 1446-1453
- 200- Slivka A, Murphy E, Horrocks L (1995) Cerebral edema after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 26: 1061-5; discussion 1065-6
- 201- Smrcka M, Ogilvy C S, Crow R J, Maynard K I, Kawamata T, Ames A 3 (1998) Induced hypertension improves regional blood flow and protects against infarction during focal ischemia: time course of changes in blood flow measured by laser Doppler imaging. *Neurosurgery* 42: 617-24; discussion 624-5
- 202- Staessen J A, Gasowski J, Wang J G, Thijs L, Den Hond E, Boissel J P, Coope J, Ekblom T, Gueyffier F, Liu L, Kerlikowske K, Pocock S, Fagard R H (2000) Risks of untreated and treated isolated systolic hypertension in the elderly: meta-analysis of outcome trials. *Lancet* 355: 865-872
- 203- Stanisz G J, Henkelman R M (2000) Gd-DTPA relaxivity depends on macromolecular content. *Magn Reson Med* 44: 665-667
- 204- Stejskal E, Tanner J (1965) Spin diffusion measurements: spin-echoes in the presence of a time-dependant field gradient. *J Chem Phys* 42: 288-292
- 205- Stroke Unit Trialists' Collaboration (2000) Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. . *Cochrane Database Syst Rev* : CD000197
- 206- Symon L, Branston N M, Chikovani O (1979) Ischemic brain edema following middle cerebral artery occlusion in baboons: relationship between regional cerebral water content and blood flow at 1 to 2 hours. *Stroke* 10: 184-191
- 207- Taillefer M, Denault A Y (2005) Cerebral near-infrared spectroscopy in adult heart surgery: systematic review of its clinical efficacy. *Can J Anaesth* 52: 79-87
- 208- Takano K, Tatlisumak T, Bergmann A G, Gibson, D G, 3rd, Fisher M (1997) Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats. *J Neurol Sci* 153: 8-11
- 209- Tamura A, Graham D I, McCulloch J, Teasdale G M (1981) Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 53-60
- 210- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. . *N Engl J Med* 333: 1581-1587
- 211- Thorvaldsen P, Davidsen M, Bronnum-Hansen H, Schroll M (1999) Stable stroke occurrence despite incidence reduction in an aging population: stroke trends in the danish monitoring trends and determinants in cardiovascular disease (MONICA) population. *Stroke* 30: 2529-2534
- 212- Tofts P S, Berkowitz B A (1994) Measurement of capillary permeability from the Gd enhancement curve: a comparison of bolus and constant infusion injection methods. *Magn Reson Imaging* 12: 81-91
- 213- Tsai S K, Lin S M, Hung W C, Mok M S, Chih C L, Huang S S (2004) The effect of desflurane on ameliorating cerebral infarction in rats subjected to focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *Life Sci* 74: 2541-2549

- 214- Tsai Y C, Huang S J, Lai Y Y, Chang C L, Cheng J T (1994) Propofol does not reduce infarct volume in rats undergoing permanent middle cerebral artery occlusion. *Acta Anaesthesiol Sin* 32: 99-104
- 215- Ullman J (1999) Vasopressin and angiotensin II in blood pressure control during isoflurane anesthesia in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 43: 860-865
- 216- Umegaki M, Sanada Y, Waerzeggers Y, Rosner G, Yoshimine T, Heiss W, Graf R (2005) Peri-infarct depolarizations reveal penumbra-like conditions in striatum. *J Neurosci* 25: 1387-1394
- 217- Vaucher E, Borredon J, Seylaz J, Lacombe P (1995) Autoradiographic distribution of cerebral blood flow increases elicited by stimulation of the nucleus basalis magnocellularis in the unanesthetized rat. *Brain Res* 691: 57-68
- 218- Vernieri F, Tibuzzi F, Pasqualetti P, Rosato N, Passarelli F, Rossini P M, Silvestrini M (2004) Transcranial Doppler and near-infrared spectroscopy can evaluate the hemodynamic effect of carotid artery occlusion. *Stroke* 35: 64-70
- 219- Villringer A, Planck J, Hock C, Schleinkofer L, Dirnagl U (1993) Near infrared spectroscopy (NIRS): a new tool to study hemodynamic changes during activation of brain function in human adults. *Neurosci Lett* 154: 101-104
- 220- Warach S, Latour L L (2004) Evidence of reperfusion injury, exacerbated by thrombolytic therapy, in human focal brain ischemia using a novel imaging marker of early blood-brain barrier disruption. *Stroke* 35: 2659-2661
- 221- Ward K R, Ivatury R R, Barbee R W, Turner J, Pittman R, Filho I P T, Spiess B (2006) Near infrared spectroscopy for evaluation of the trauma patient: a technology review. *Resuscitation* 68: 27-44
- 222- Wardlaw J M (2001) Overview of Cochrane thrombolysis meta-analysis. *Neurology* 57: S69-76
- 223- Warner D S, Takaoka S, Wu B, Ludwig P S, Pearlstein R D, Brinkhous A D, Dexter F (1996) Electroencephalographic burst suppression is not required to elicit maximal neuroprotection from pentobarbital in a rat model of focal cerebral ischemia. *Anesthesiology* 84: 1475-1484
- 224- Warner D S, Zhou J G, Ramani R, Todd M M (1991) Reversible focal ischemia in the rat: effects of halothane, isoflurane, and methohexital anesthesia. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 794-802
- 225- Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, Knab R, Fiebach J B, Schellinger P D, Kucinski T, Jungehulsing G J, Brunecker P, Muller B, Banasik A, Amberger N, Wernecke K D, Siebler M, Rother J, Villringer A, Weih M (2004) Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* 35: 616-621
- 226- Werner C, Mollenberg O, Kochs E, Schulte J A E (1995) Sevoflurane improves neurological outcome after incomplete cerebral ischaemia in rats. *Br J Anaesth* 75: 756-760
- 227- White B C, Sullivan J M, DeGracia D J, O'Neil B J, Neumar R W, Grossman L I, Rafols J A, Krause G S (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 179: 1-33
- 228- Wolf P A, D'Agostino R B, Belanger A J, Kannel W B (1991) Probability of stroke: a risk profile from the Framingham Study. *Stroke* 22: 312-318

- 229- Xia Z, Godin D V, Ansley D M (2004) Application of high-dose propofol during ischemia improves postischemic function of rat hearts: effects on tissue antioxidant capacity. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 919-926
- 230- Xiang Z, Yuan M, Hassen G W, Gampel M, Bergold P J (2004) Lactate induced excitotoxicity in hippocampal slice cultures. *Exp Neurol* 186: 70-77
- 231- Yang G, Chan P H, Chen J, Carlson E, Chen S F, Weinstein P, Epstein C J, Kamii H (1994) Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke* 25: 165-170
- 232- Yang Y, Yang T, Li Q, Wang C X, Shuaib A (2002) A new reproducible focal cerebral ischemia model by introduction of polyvinylsiloxane into the middle cerebral artery: a comparison study. *J Neurosci Methods* 118: 199-206
- 233- Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R (2002) 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* 9: 112-121
- 234- Zhan R Z, Qi S, Wu C, Fujihara H, Taga K, Shimoji K (2001) Intravenous anesthetics differentially reduce neurotransmission damage caused by oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices in correlation with N-methyl-D-aspartate receptor inhibition. *Crit Care Med* 29: 808-813
- 235- Zheng S, Zuo Z (2003) Isoflurane preconditioning reduces purkinje cell death in an in vitro model of rat cerebellar ischemia. *Neuroscience* 118: 99-106
- 236- Zheng S, Zuo Z (2004) Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of P38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* 65: 1172-1180
- 237- Zhu H, Cottrell J E, Kass I S (1997) The effect of thiopental and propofol on NMDA- and AMPA-mediated glutamate excitotoxicity. *Anesthesiology* 87: 944-951
- 238- del Zoppo G J, Higashida R T, Furlan A J, Pessin M S, Rowley H A, Gent M (1998) PROACT: a phase II randomized trial of recombinant pro-urokinase by direct arterial delivery in acute middle cerebral artery stroke. PROACT Investigators. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *Stroke* 29: 4-11
- 239- del Zoppo G J, von Kummer R, Hamann G F (1998) Ischaemic damage of brain microvessels: inherent risks for thrombolytic treatment in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65: 1-9
- 240- van der Worp H B, de Haan P, Morrema E, Kalkman C J (2005) Methodological quality of animal studies on neuroprotection in focal cerebral ischaemia. *J Neurol* 252: 1108-1114

Liste des abbréviations.

ACA	Artère cérébrale antérieure
AChA	Artère choroïdienne antérieure
ACI	Artère carotide interne
ACM	Artère cérébrale moyenne
AComP	Artère communicante postérieure
ACP	Artère cérébrale postérieure
ADC	Coefficient de diffusion apparent
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AIT	Accident ischémique transitoire
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate
ARM	Angiographie par résonance magnétique
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
b-FGF	Basic fibroblast growth factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CMRO ₂	Consommation cérébrale en oxygène
DO	Densité optique
dpm	Désintégrations par minute
DSC	Débit sanguin cérébral
DWI	Imagerie pondérée en diffusion
eNOS	Nitrique oxyde synthase endothéliale
ET	Ecart-type
FiO ₂	Fraction inspirée en oxygène
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
Gd-DOTA	Gadotérate de méglumine
Gd-DTPA	Gadopentétate de méglumine
GDNF	Glial cell-line derived neurotrophic factor
HC	Hémorragie cérébrale
HE	Hématoxyline éosine
HSA	Hémorragie sous-arachnoïdienne
IC	Infarctus cérébral
ICG	Vert d'indocyanine
IL6	Interleukine 6
iNOS	Nitrique oxyde synthase inductible

IP	Intrapéritonéal
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IV	Intraveineux
MAC	Concentration alvéolaire minimale
MMP	Métalloprotéase
NIRS	Spectroscopie proche-infrarouge
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
nNOS	Nitrique oxyde synthase neuronale
NOS	Nitrique oxyde synthase
PAM	Pression artérielle moyenne
PCr	Phosphocréatine
PIC	Pression intracrânienne
Post-MCAO	Post occlusion de l'artère cérébrale moyenne
PPC	Pression de perfusion cérébrale
RF	Radiofréquence
ROI	Région d'intérêt
ROS	Espèces oxygénées réactives
rt-PA	Activateur tissulaire recombinant du plasminogène
SG	Gravité spécifique
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxyde dismutase
T ₁ W	Imagerie pondérée T ₁
TGF-β	Transforming growth factor beta
TIMP	Inhibiteur de métalloprotéase
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TTC	Chlorure de triphényltétrazolium
TVC	Thrombose veineuse cérébrale
VOI	Volume d'intérêt