



HAL
open science

Canaux potassiques du muscle lisse vasculaire au cours du processus d'ischémie reperfusion : cibles pharmacologiques potentielles de la plasticité cérébrale?

Fabrice Plaisier

► To cite this version:

Fabrice Plaisier. Canaux potassiques du muscle lisse vasculaire au cours du processus d'ischémie reperfusion : cibles pharmacologiques potentielles de la plasticité cérébrale?. Neurosciences [q-bio.NC]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT: . tel-00342306

HAL Id: tel-00342306

<https://theses.hal.science/tel-00342306>

Submitted on 27 Nov 2008

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

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

UNIVERSITE DE LILLE II
Faculté de médecine

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR de L'UNIVERSITE de LILLE II

Spécialité: Neurosciences

Présentée par

Fabrice Plaisier

**Canaux potassiques du muscle lisse vasculaire cérébral au cours du processus
d'ischémie-reperfusion : cibles potentielles dans la plasticité cérébrale ?**

Directeur de Thèse : Michèle Bastide

Soutenu le 30 septembre 2008

JURY

Christiane Charriaut-Marlangue

Jean Pierre Savineau

Christine Capdeville-Atkinson

Roméo Cecchelli

Michèle Bastide

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

A mon père[†]

A ma mère, mon frère, ma famille

A mes amis

Remerciements

Je remercie Mme le Directeur de Recherche Christiane Charriaut-Marlangue et Mr le Professeur Jean-Pierre Savineau d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour avoir accompli cette lourde tâche.

Mme le Professeur Christine Capdeville-Atkinson, vous m'avez fait un grand honneur en acceptant la présidence de ce jury. Acceptez en retour la marque de mon plus profond respect.

Merci également à Mr le Professeur Roméo Cecchelli d'avoir accepté de siéger dans le jury pour examiner ce travail.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude au Professeur Régis Bordet pour m'avoir donné la possibilité de poursuivre mes études au sein du laboratoire de Pharmacologie de la mort neuronale et de la plasticité cérébrale de l'IFR 114. Merci pour votre écoute, votre confiance et votre soutien dont vous m'avez fait preuve tout au long de ces années. Vous avez acquis ma reconnaissance et mon plus profond respect, pour toujours.

Michèle, j'ai eu la chance de pouvoir effectuer ces travaux sous ta responsabilité. Je te remercie pour la qualité de ton encadrement, toujours appréciée par les étudiants, qui sait faire la différence face aux problèmes rencontrés. Ta patience, ta rigueur, ta disponibilité ainsi que ta bonne humeur sont autant de qualités qui ont permis de me guider dans cette discipline difficile qu'est l'électrophysiologie. Merci pour tes encouragements sans faille ainsi que l'opportunité de m'avoir fait toucher à l'enseignement. Les mots ne suffiront pas à donner l'ampleur de ma gratitude et de ma reconnaissance. Pour tout cela accepte mon amitié la plus sincère et respectueuse.

L'achèvement de cette thèse est l'occasion pour moi de remercier celles et ceux qui m'ont aidé au cours de ces années, ces résultats étant le fruit d'un travail collectif accompli sur la durée. J'exprime toute ma sympathie aux différents membres de l'équipe pour leur accueil et leur disponibilité.

Je tiens pour cela à remercier particulièrement Olivier et Patrick qui m'ont fait part de leur expérience lors de mon arrivée au laboratoire. Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers Maud, Cécile, Servane et Thavarak ainsi que toutes les autres personnes (elles se reconnaîtront !) qui m'ont apporté leur savoir faire technique, leur soutien moral ou leur enthousiasme en participant de près ou de loin aux différents protocoles expérimentaux. Merci également à vous Bérangère, Sabine, Nadine, Jackie, Claudia et Christian pour votre spontanéité, votre aide précieuse à des moments clés et pour tous les bons moments passés avec vous.

Je tiens à dédier ce travail à ma mère et à mon frère qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans les moments difficiles, merci pour l'éducation et les valeurs que vous avez su me donner malgré ce qui est arrivé. Enfin, j'ai une pensée pour mon père. J'essaye de mener ma vie au gré des difficultés et des doutes rencontrés pour que, là où tu es, tu sois fier de moi.

Je remercie la Région Nord Pas-de-Calais et l'Université de Lille II pour m'avoir octroyé une allocation de recherche pendant une partie de mon travail de thèse.

Table des Matières

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

GENERALITES

I. Le système nerveux.....	5
I.A. Organisation du Système Nerveux Central	5
I.A.1. L'encéphale	5
I.A.2. Les méninges.....	6
I.A.3. La moelle épinière	7
I.B. Organisation du Système Nerveux Périphérique.....	7
I.C. Voies nerveuses impliquées dans la somesthésie et la motricité volontaire.....	8
I.C.1. La somesthésie	9
I.C.2. Contrôle du mouvement volontaire.....	9
I.D. Caractéristiques du tissu neuro-glial.....	11
I.D.1. Les neurones.....	11
I.D.2. Les cellules gliales	14
II. Les territoires artériels cérébraux	16
II.A. Le système carotidien	17
II.B. Le système vertébro-basilaire	19
II.C. Le polygone de Willis.....	21
III. La vascularisation cérébrale	22
III.A. Le réseau artériel cérébral.....	23
III.B. La microcirculation cérébrale	24
III.C. La régulation de la perméabilité vasculaire par la barrière hémato-encéphalique. 26	
III.C.1 Caractéristiques des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique	26
III.C.2 Echanges au niveau de la BHE	27
III.D. Le réseau veineux cérébral.....	28
III.E. Le drainage veineux	29
IV. Le muscle lisse vasculaire cérébral	30
IV.A. Généralités	30
IV.B. Les myocytes vasculaires forment un muscle unitaire syncytial	31
IV.C. L'appareil contractile du muscle lisse des artères cérébrales	32
IV.D. Couplage excitation-contraction du muscle lisse vasculaire	34
IV.D.1 Mécanisme de l'élévation du Ca ²⁺ intracellulaire	36
IV.D.2 Sensibilisation-désensibilisation de l'appareil contractile.....	38

V.	Régulation du potentiel de membrane par les canaux potassiques de la cellule musculaire lisse	40
V.A.	Rôles physiologiques des canaux ioniques au sein du muscle lisse vasculaire cérébral	40
V.B.	Rôles physiologiques des canaux potassiques au sein du muscle lisse vasculaire cérébral	41
V.B.1	Les canaux potassiques rectifiants entrants (Kir2.x).....	42
V.B.2	Les canaux potassiques voltage dépendants (K_v).....	45
V.B.3	Les canaux potassiques calcium-dépendants ($K_{Ca^{2+}}$).....	47
V.B.4	Les canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}).....	49
V.B.5	Les canaux TRP	50
V.B.6	Les canaux potassiques à deux domaines P (K2P)	51
VI.	Influences physiologiques exercées sur le muscle lisse vasculaire cérébral	52
VI.A.	L'influence du compartiment endothélial	52
VI.A.1.	Le monoxyde d'azote (NO) et la voie GMPc/PKG.....	52
VI.A.2.	La prostacycline.....	54
VI.A.3.	Les substances hyperpolarisantes dépendantes de l'endothélium (EDHF) ...	54
VI.A.4.	L'endothéline.....	56
VI.B.	Le mécanisme d'autorégulation.....	56
VI.C.	L'influence nerveuse.....	58
VI.C.1.	L'innervation extrinsèque.....	58
VI.C.2.	L'innervation intrinsèque	60
VI.D.	L'hyperémie fonctionnelle.....	61
VI.D.1.	L'activité synaptique contrôle le DSC.....	61
VI.D.1.a	La relaxation potassium-dépendante	63
VI.D.1.b.	La propagation rétrograde de la vasodilatation.....	64
VII.	La physiopathologie de l'ischémie-reperfusion cérébrale	66
VII.A.	Les accidents vasculaires cérébraux	66
VII.A.1.	Définition.....	66
VII.A.2.	Les facteurs prédisposants	66
VII.A.3.	Autres facteurs de risque	68
VII.B.	Origines d'un infarctus cérébral ischémique	68
VII.B.1	Mécanisme embolique	68
VII.B.2.	Mécanisme hémodynamique	69
VII.B.3.	Atteinte des artères perforantes	69
VII.B.4.	Autres mécanismes	69
VII.C.	Conséquences cérébro-vasculaires de l'ischémie cérébrale.....	70
VII.C.1.	Conséquences au sein du tissu nerveux.....	70
VII.C.2.	Conséquences vasculaires.....	72

VII.D.	Mécanismes cellulaires lésionnels	76
VII.D.1.	Mécanismes délétères précoces	76
VII.D.2	Mécanismes délétères retardés	81
VII.E.	Conséquences fonctionnelles de l'ischémie cérébrale	82
VII.E.1.	Syndrome de focalisation	82
VII.E.2.	Evolution de l'AVC	85
VII.E.3.	La Plasticité cérébrale	86
VII.E.4.	La rééducation	89
VII.F.	Cibles pharmacologiques de l'ischémie cérébrale	90
I.F.1.	Traitements préventifs des AVC	90
I.F.2.	Traitement curatif des infarctus cérébraux	91
VIII.	Présentation du travail	99

MATÉRIEL ET METHODES

I.	Animaux	102
II.	Ischémie-reperfusion cérébrale focale chez le rat	102
II.A.	Modèle d'occlusion intraluminaire de l'artère cérébrale moyenne	102
II.B.	Paramètres physiologiques	103
III.	Histomorphométrie	104
III.A.	Prélèvements et coupes histologiques	104
III.B.	Coloration histologique au crésyl violet	104
III.C.	Quantification du volume de l'infarctus	105
III.D.	Œdème cérébral	105
IV.	Protocoles pharmacologiques	106
IV.A.	Protocole expérimental d'administration de la stobadine	106
IV.B.	Protocole expérimental du fénofibrate	106
V.	Étude électrophysiologique de la cellule musculaire lisse de l'artère cérébrale moyenne 107	
V.A.	Dissociation des cellules musculaires lisses	107
V.B.	Technique de patch-clamp	107
V.B.1.	Principe	107
V.B.2.	Les différentes configurations membranaires utilisées	108
V.B.3.	Composition des milieux utilisés	110
V.C.	Étude des courants potassiques de la cellule musculaire lisse	110
V.C.1.	Les canaux potassiques de la cellule musculaire lisse	110
V.C.2.	Les différents modulateurs du courant Kv utilisés	114
VI.	Méthodes d'analyse de la fonction vasculaire cérébrale	115
VI.A.	Prélèvement de l'artère cérébrale moyenne	115
VI.B.	Artériographe d'Halpern	115

VI.B.1.	Principe du système	115
VI.B.2.	Canulage de l'artère cérébrale moyenne	116
VI.C.	Protocoles d'étude de la réactivité vasculaire	117
VI.C.1.	Le tonus myogénique de l'artère cérébrale.....	117
VI.C.1.a.	Etude de la relaxation musculaire lisse potassium-dépendante sensible au Ba ²⁺	118
VI.C.1.b.	Etude de la vasoconstriction et de la vasodilatation endothélium dépendante	119
VI.C.1.c.	Etude de la relaxation endothélium-indépendante et contrôle de la viabilité de l'artère cérébrale.....	119
VII.	Les tests comportementaux	120
VII.A.	Test du rotarod	120
VII.A.1.	Principe du test	121
VII.A.2.	Phase de conditionnement	121
VII.A.3.	Système d'évaluation.....	121
VII.B.	Test du ruban adhésif (adhesive removal test).....	121
VII.B.1.	Principe du test	121
VII.B.2.	Phase de conditionnement	122
VII.B.3.	Système d'évaluation.....	122
VII.C.	Test de l'agrippement (prehensile traction task).....	123
VII.C.1.	Principe du test	123
VII.C.2.	Système d'évaluation.....	123
VII.C.3.	Synthèse chronologique des différents tests comportementaux utilisés en fonction du protocole pharmacologique expérimental	124
VIII.	Analyse statistique.....	125

RESULTATS

I.	Mise en place des altérations cérébrovasculaires et comportementales à la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion (à 24 heures de reperfusion).....	127
I.A.	Lésions cérébrales à 24 heures de reperfusion	128
I.B.	Conséquences comportementales à 24 heures de reperfusion.....	128
I.C.	Altérations électrophysiologiques vasculaires à 24 heures de reperfusion	129
I.C.1.	Densité de courant Kir2.x à 24 heures de reperfusion	129
I.D.	Densité de courant Kv et modulation par la voie du NO/GMPc/PKG à 24 heures de reperfusion.....	130
I.D.1.	Caractérisation de la densité de courant Kv et de sa diminution suite à l'ischémie-reperfusion	130
I.D.2.	Mise en évidence d'une régulation spécifique du courant Kv par le NO sur des cellules ischémiées-reperfusées	132

I.D.3.	Mise en évidence de l'implication délétère de la voie NO/GMPc/PKG sur les cellules ischémisées-reperfusées	133
I.E.	Relaxation musculaire lisse potassium-dépendante sensible au baryum à 24 heures de reperfusion	139
I.F.	Relaxation endothélium-dépendante à 24 heures de reperfusion	139
I.G.	Propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne à 24 heures de reperfusion	140
I.G.1.	Le tonus myogénique à 24 heures de reperfusion	140
I.G.2.	Les autres propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne à 24 heures de reperfusion	141
II.	Évolution spontanée des lésions cérébrovasculaires de la période aiguë à la période subaiguë du processus d'ischémie reperfusion (24 heures, 3 jours, 7 jours)	142
II.A.	Evolution des lésions cérébrales au cours du temps	143
II.B.	Evolution de la récupération sensori-motrice au cours du temps	143
II.B.1.	Test du ruban adhésif	143
II.B.2.	Test de l'agrippement (la traction préhensile).....	144
II.B.3.	Test du rotarod à 24 heures et 3 jours de reperfusion	145
II.C.	Évolution de la densité de courant Kir2.x au cours du temps.....	146
II.D.	Evolution de la Relaxation potassium-dépendante sensible au baryum au cours du temps	147
II.E.	Evolution de la relaxation endothélium-dépendante au cours du temps	148
II.F.	Évolution des propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne au cours du temps	148
II.F.1.	Evolution du tonus myogénique au cours du temps.....	148
II.F.2.	Evolution des propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne au cours du temps	149
III.	Approches pharmacologiques neuroprotectrices (la Stobadine et le Fénofibrate).....	150
III.A.	La stobadine	151
III.A.1.	Effet de la Stobadine sur les lésions cérébrales.....	151
III.A.2.	Effet de la Stobadine sur la densité de courant Kir2.x de la cellule musculaire lisse	152
III.A.3.	Effet de la Stobadine sur la relaxation potassium-dépendante sensible au baryum	152
III.A.4.	Effet de la Stobadine sur la relaxation endothélium-dépendante	153
III.A.5.	Effet de la Stobadine sur les propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne	153
III.B.	Le Fénofibrate (agoniste PPARs- α).....	156
III.B.1.	Volumes d'infarctus à 3 jours de reperfusion.....	156
III.B.2.	Relaxation potassium dépendante	157
III.B.3.	Relaxation endothélium dépendante.....	158
III.B.4.	Test comportementaux	158

PUBLICATIONS

Stobadine-induced hastening of sensorimotor recovery after focal ischemia/reperfusion is associated with cerebrovascular protection.

Neurogliovascular unit after cerebral ischemia: Is the vascular wall a pharmacological target.

DISCUSSION

I.	Résumé des resultats	161
II.	Altérations électrophysiologiques des cellules musculaires lisses à la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion cérébrale	163
II.A.	Rôle de la reperfusion dans l'altération du courant Kir2.x et du couplage neurovasculaire qui lui est associé.....	163
II.B.	Mise en évidence de l'altération des canaux Kv à la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion	165
II.C.	Altération de la densité de courant Kv suite au processus d'ischémie reperfusion cérébrale avec une implication de l'hypoxie (ischémie) et de la reperfusion.	166
II.D.	Implication de la voie du NO dans la régulation du courant Kv en condition basale et après ischémie reperfusion.	167
II.E.	Participation des canaux K_{Ca} et K_{ATP} aux altérations électrophysiologiques à la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion	170
III.	Altérations des propriétés mécaniques du vaisseau à la phase aiguë	171
III.A.	Altération du muscle lisse vasculaire cérébral	171
III.B.	Altération de la relaxation endothelium-dépendante	173
III.	Plasticité et approches pharmacologiques	174
III.A.	Plasticité ionique et stratégies pharmacologiques.....	174
III.B.	Plasticité vasculaire et stratégies pharmacologiques	175
III.C.	Plasticité cérébrale et stratégies pharmacologiques	177
IV.	Conclusion et perspectives	183

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Table des Illustrations

Tableau 1: Valeurs des capacités membranaires des différents groupes de cellules au cours des différents enregistrements par la technique du patch-clamp	112
Tableau 2: Les différents modulateurs utilisés	115
Tableau 3: Propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne à 24 heures de reperfusion	141
Tableau 4: Evolution des propriétés actives au cours du temps.....	149
Tableau 5: Evolution des volumes d'infarctus et d'oedème comparés entre les animaux traités par la Stobadine et par son Véhicule	151
Tableau 6: Effets de la Stobadine sur les propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne ..	155
Figure 1: Organisation générale de l'encéphale.....	6
Figure 2: Les méninges	7
Figure 3: Les différentes aires fonctionnelles du cortex	9
Figure 4: Voies motrices impliquées dans le contrôle du mouvement volontaire (Richard et Orsal, 2001).....	10
Figure 5: Schéma explicatif de la polarité des neurones: de l'émission d'un potentiel post-synaptique à l'élaboration et la propagation d'un potentiel d'action.....	11
Figure 6: Classification des neurones selon leurs prolongements.....	12
Figure 7: Représentation schématique des principaux territoires artériels du cerveau	16
Figure 8: Le système carotidien	17
Figure 9: Les ramifications de l'artère cérébrale moyenne et ses territoires artériels correspondants.....	18
Figure 10: Les ramifications de l'artère cérébrale antérieure et ses territoires artériels correspondants.....	19
Figure 11: Représentation schématique des artères du cerveau.....	20
Figure 12: Les artères cérébrales postérieures et communicantes postérieures et leurs territoires artériels respectifs	21
Figure 13: Le polygone de Willis.....	22
Figure 14: Organisation générale du système vasculaire	23
Figure 15: Structure d'une artère	24
Figure 16: Organisation de la microcirculation cérébrale	25
Figure 17: Les jonctions serrées des cellules endothéliales	27
Figure 18: Les différents types de transport à travers la barrière hémato-encéphalique.....	28
Figure 19: Représentation du drainage veineux cérébral	30
Figure 20: Les composants cellulaires de la contraction du muscle lisse	33
Figure 21: Contraction de la cellule musculaire lisse	34
Figure 22: Mécanisme de libération de calcium induite par des canaux calciques (CCICR) ..	38
Figure 23: Voies de signalisation impliquées dans la réponse contractile du muscle lisse	40
Figure 24: Régulation du tonus vasculaire par les canaux potassiques des myocytes	42
Figure 25: Structure des canaux Kir.....	42
Figure 26: Propriétés électrophysiologiques des canaux Kir2.x	44
Figure 27: Voies potentielles de régulation des canaux Kir2.x du muscle lisse vasculaire	45
Figure 28: Structure générale des canaux Kv.....	46
Figure 29: Structure générale des canaux KCa et leurs voies de régulation	48
Figure 30: Structure générale des K _{ATP} et leurs voies de régulation.....	49
Figure 31: Structure générale des TRP et exemple d'activation mécanosensible (TRPM4) ...	50
Figure 32: Structure générale des canaux potassiques à deux domaines transmembranaires..	51
Figure 33: Participation du NO dans les voies intracellulaires de la relaxation du myocyte vasculaire.....	53

Figure 34: Vasodilatation par l'EDHF des artères cérébrales	56
Figure 35: Exemples d'autorégulation d'une artériole	58
Figure 36: Innervation extrinsèque et intrinsèque du système vasculaire cérébral	59
Figure 37: Les agents vasoactifs libérés par les neurones et les astrocytes lors de l'activité synaptique.....	62
Figure 38: Mouvements de K^+ au sein de l'unité-neuro-glio-vasculaire	63
Figure 39: Les mécanismes cellulaires de la propagation rétrograde de la vasodilatation	65
Figure 40: Organisation des lésions cérébrales au décours du processus d'ischémie reperfusion cérébrale	71
Figure 41: Dégradation des constituants de la matrice extracellulaire au cours de l'ischémie reperfusion.....	74
Figure 42: Evolution des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'ischémie cérébrale	76
Figure 43: Radicaux libres et leurs conséquences délétères	79
Figure 44: Atteintes des différentes régions cérébrales du territoire carotidien	84
Figure 45: Atteintes des différentes régions cérébrales du territoire vertébro-basilaire et de l'artère cérébrale postérieure	85
Figure 46: Représentation schématique de la chronologie de la récupération.....	87
Figure 47: Mécanismes moléculaires de la potentialisation à long terme post-ischémique (i-LTP)	88
Figure 48: Essais cliniques neuroprotecteurs à la phase aiguë de l'accident vasculaire cérébral	94
Figure 49: Exemples de modulations transcriptionnelles par le récepteur nucléaire PPAR- α	98
Figure 50: Modèle d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne.....	103
Figure 51: Les différentes coupes nécessaires au calcul du volume de l'infarctus cérébral... ..	104
Figure 52: Zones de quantification du volume de l'infarctus	105
Figure 53: La Stobadine et son protocole expérimental d'administration	106
Figure 54: Le Fénofibrate et son protocole expérimental d'administration.....	107
Figure 55 : Configuration whole-cell	109
Figure 56: structure de l'amphotéricine B	110
Figure 57: Mesure de la capacité membranaire	111
Figure 58: Protocole de stimulation pour l'enregistrement du courant Kir2.x	113
Figure 59: Blocage séquentiel et protocole de stimulation pour l'enregistrement du courant Kv	114
Figure 60: Principe de l'artériographe d'Halpern	116
Figure 61: Canulage de l'artère cérébrale moyenne	117
Figure 62: Etude vasculaire du tonus myogénique	118
Figure 63: Etude vasculaire du mécanisme relaxant Kir2.x-dépendant.....	119
Figure 64: Vasoconstriction et vasodilatation dépendantes de l'endothélium	119
Figure 65: Vasorelaxation endothélium indépendante induite par l'application de SNP 10 μ M	120
Figure 66: Test du rotarod	121
Figure 67: Test du ruban adhésif.....	122
Figure 68: Test de l'agrippement.....	123
Figure 69: Figure récapitulative des différents tests comportementaux utilisés	124
Figure 70: Volumes d'infarctus et d'œdème à 24 heures de reperfusion.....	128
Figure 71: Altérations comportementales évaluées par les différents tests à 24 heures de reperfusion.....	129
Figure 72: Relation densité de courant Kir2.x - potentiel et valeur de la densité de courant Kir2.x à -135mV en condition I/R 24h et Sham	130

Figure 73: Caractérisation du courant Kv de la cellule musculaire lisse et de son altération à 24 heures de reperfusion en configuration cellule entière.....	131
Figure 74: Evaluation d'une régulation du courant Kv par le NO par l'application de DEA-NONOate.....	132
Figure 75: Potentialisation de l'altération du courant Kv par un donneur de NO en conditions d'ischémie-reperfusion 24h	133
Figure 76: Action des modulateurs utilisés de la voie NO/GMPc/PKG sur la densité de courant Kv de la cellule musculaire lisse	134
Figure 77: Effets des modulateurs de la voie NO/GMPc/PKG en condition Sham.....	135
Figure 78: Evaluation de l'implication délétère de la voie NO/GMPc/PKG de la cellule musculaire lisse sur la densité de courant Kv à 24 heures de reperfusion	135
Figure 79: Densité de courant Kv à +40 mV suite à l'application de modulateurs de la voie NO/GMPc/PKG à 24 heures de reperfusion	136
Figure 80: Caractérisation du courant Kv de la cellule musculaire lisse et de son altération à 24 heures de reperfusion en configuration patch-perforé.....	137
Figure 81: Restauration de la densité de courant Kv suite à l'application d'ODQ sur les cellules ischémiées reperfusées 24 heures	138
Figure 82: Restauration de la densité de courant Kv illustrée à +40mV suite à l'application d'ODQ sur les cellules ischémiées reperfusées 24 heures.....	139
Figure 83: Représentation de la relaxation musculaire lisse induite par 15 mM KCl à 24 heures de reperfusion	139
Figure 84: Relaxation endothélium-dépendante à 24 heures de reperfusion	140
Figure 85: Altération du tonus myogénique à 24 heures de reperfusion	141
Figure 86: Evolution au cours du temps des volumes d'infarctus et de l'œdème à 24h, 3 et 7 jours de reperfusion suite à la MCAO.....	143
Figure 87: Test du ruban adhésif au cours de la période d'étude	144
Figure 88: Test de la préhension tractile au cours de la période d'étude.....	145
Figure 89: Test du rotarod à 24 heures et 3 jours de reperfusion.....	146
Figure 90: Récupération progressive de la densité de courant Kir2.x à 7 jours de reperfusion	147
Figure 91: Récupération de la relaxation musculaire lisse induite par 15 mM KCl au cours du temps	148
Figure 92: Evolution de la relaxation endothélium-dépendante au cours du temps	148
Figure 93: Récupération de la réponse contractile spontanée du muscle lisse au cours du temps	149
Figure 94: Evolution des volumes d'infarctus et d'œdème chez les animaux traités par la Stobadine.....	152
Figure 95: Effet d'un traitement par la Stobadine sur le courant Kir2.x de la cellule musculaire lisse.....	152
Figure 96: Effet d'un traitement par la Stobadine sur la relaxation potassium-dépendante sensible au baryum.....	153
Figure 97: Effet protecteur de la Stobadine sur la relaxation endothélium-dépendante	153
Figure 98: Effet de la Stobadine sur la réponse contractile spontanée du muscle lisse	154
Figure 99: Accélération de la récupération fonctionnelle sensorimotrice par le traitement à la Stobadine.....	155
Figure 100: Accélération de la récupération fonctionnelle motrice par le traitement à la Stobadine.....	156
Figure 101: Effet du Fénofibrate (50 mg/kg/j) à 3 jours de reperfusion sur le volume d'infarctus et de l'œdème	156

Figure 102: Effets neuroprotecteurs de la stobadine et du fénofibrate en phase aiguë à 3 jours de reperfusion	157
Figure 103: Effet du traitement à 3 jours par le fénofibrate à 50 mg/kg/j sur la relaxation potassium dépendante sensible au baryum.....	158
Figure 104: Effet du traitement à 3 jours par le fénofibrate à 50 mg/kg/j sur la relaxation endothélium-dépendante	158
Figure 105: Accélération de la récupération fonctionnelle motrice à 3 jours par le traitement au Fénofibrate à la dose de 50 mg/kg/j	159
Figure 106: Évaluation de l'effet du fénofibrate sur la fonction sensorimotrice	159

Liste des abréviations

5-HT	Sérotonine (5-hydroxytryptamine)
AA	Acide Arachidonique
Transporteurs ABC	ATP binding cassette
ACh	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Apoptosis-inducing factor
AMPA	Méthyl P aspartate
APAF-1	Facteur activateur de l'apoptose
AQP4	Aquaporine 4
ADP	Adénosine di phosphate
ATP	Adénosine tri phosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
Bax, Bid	Protéines pro-apoptotique
Bcl-2, Bcl-XI	Protéines anti-apoptotiques
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BKCa	Canaux potassiques calcium-dépendants à grande conductance
CamKII	Calmoduline kinase II
CCICR	Calcium-channel induced calcium released
CGRP	Calcitonin gene related peptide
CICR	Calcium-induced calcium released
COX	Cyclooxygénase
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cx	Connexines
DAG	Diacylglycérol
DSC	Débit sanguin cerebral
EDCF	Endothelium-derived contracting factor
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EEG	Électroencéphalogramme
EETs	Acides epoxyeicosatriénoïques
ERK 1/2	Extracellular signal related kinases
ET	Endothélines
GABA	Acide gamma aminobutyrique
GLUT	Transporteur protéique spécifique du glucose
GMPc	Guanosine 3' 5' monophosphate cyclique

GSH	Glutation à l'état réduit
GTP	Guanosine 5' triphosphate
HDL	High density lipoprotein
HIF-1	Facteur induit par l'hypoxie
ICAM	Integrin cell adhesion molecule
IKCa	Canaux potassiques calcium-dépendants à conductance intermédiaire
i-LTP	Potentialisation à long terme post-ischémique
IP₃	Inositol tri-phosphate
I/R (=24h, 3J ou 7J)	Ischémie-reperfusion (avec une reperfusion de 24 heures, 3 jours ou 7 jours)
IRAG	IP3 Receptor associated PKG substrat
IRF-1	Facteur régulateur des interférons
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JAM	Molécule adhésion des jonctions
K_{ATP}	Canaux potassiques ATP-dépendants
Kir2.x	Canaux potassiques à rectification entrante
KChAP	K⁺ channel accessory protein
KChIP	K⁺ channel interacting protein
Kv	Canaux potassiques voltage-dépendants
LC₂₀	Chaînes légères de la myosine
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide bactérien
MinK	Minimal K⁺ channel protein
MLCK	Myosin light chain kinase
MLCP	Myosin light chain Phosphatase
MMPs	Matrix metalloproteinases
MYPT	Sous unité régulatrice de la MLCP
NBF₁ et NBF₂	Nucleotide binding fold
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NPY	Neuropeptide Y
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
P2Y	Récepteur purinergique spécifique
P450	Cytochrome P-450 monooxygénase
PAF	Facteur d'activation plaquettaire
PDE	Phosphodiesterase
PGE₂	Prostaglandine E2
PGI₂	Prostacycline
PIP₂	Phosphatidyl-inositol-diphosphate

PKA, PKC	Proteine kinase A et C
PKG	Protéine kinase GMPc dépendante
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
PPC	Pression de perfusion cérébrale
PPRE	Peroxisome proliferator responsive element
PSD 95, SAP 97	Guanylates kinases
RVC	Résistance vasculaire cérébrale
RXR	Récepteur de l'acide cis-rétinoïque
RyR	Canaux calciques sensibles à la ryanodine
SERCA	Sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase
SNC	Système nerveux central
SNP	Nitroprussiate de sodium
SOD	Superoxyde dismutase
STAT-3	Facteur de transcription
STOCs	Spontaneous transient outward currents
SUR_{2B}	Récepteur 2B aux sulphonylurées
TNF-α	Tumor necrosis factor
(r)t-PA	Activateur tissulaire (recombinant) du plasminogène
TRP	Transient receptor potentiel channels
u-PA	Activateur urokinase du plasminogène
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VE-cadherin	Cadhérine endothéliale vasculaire
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Introduction générale

Les accidents vasculaires cérébraux constituent l'un des principaux problèmes de Santé Publique dans les pays industrialisés. Ils représentent en effet la deuxième cause de mortalité après les maladies coronariennes et sont par ailleurs la première cause de handicap et la deuxième cause de démence chez l'adulte. Les stratégies thérapeutiques actuellement utilisées reposent essentiellement sur des mesures de prévention primaire et secondaire des facteurs de risque de survenue tels que l'hypertension artérielle, le diabète, le tabagisme ou encore les dyslipidémies. Bien que leur incidence et même leur mortalité aient connu une diminution remarquable depuis ces trente dernières années grâce aux mesures préventives, les accidents vasculaires cérébraux demeurent fréquents et graves. L'incidence de cette pathologie est estimée en France entre 2 et 3 pour 1000 habitants et par an (soit 100 000 à 150 000 nouveaux cas chaque année) dont 80% des cas résultent d'un accident vasculaire de type ischémique.

Plus de la moitié des sujets ayant eu un accident vasculaire cérébral garde un handicap physique ou intellectuel permanent, avec un bilan des troubles sensorimoteurs parfois très lourd malgré la prise en charge d'une rééducation, rendant la vie quotidienne difficile. En dépit de ce pronostic, les traitements médicamenteux administrés au moment de la prise en charge clinique reposent uniquement sur l'utilisation d'agents fibrinolytiques dont le rapport bénéfice/risque n'est favorable que lorsqu'ils sont administrés dans une fenêtre thérapeutique réduite, sur l'aspirine utilisée pour ses propriétés anti-thrombotiques et sur le suivi de l'œdème cérébral. Toutefois, pour réellement diminuer les conséquences délétères de l'ischémie, et donc pour limiter l'extension des lésions et le handicap, l'instauration de mesures neuroprotectrices serait nécessaire même si aucun agent neuroprotecteur n'a encore fait la preuve de son efficacité en thérapeutique humaine.

Si l'expérimentation animale a permis de conclure, dans différents modèles, à la possibilité d'induire une neuroprotection au moyen de substances pharmacologiques, force est de constater que la plupart des traitements de neuroprotection aigus évalués en clinique sont demeurés à ce jour décevants. L'intrication des mécanismes physiopathologiques comme l'excitotoxicité, l'inflammation post-ischémique ou encore l'apoptose au sein du tissu neuroglial permet de rendre compte, au moins en partie, des difficultés à mettre au point des agents pharmacologiques à même de limiter l'extension et la sévérité des lésions en phase aiguë et subaiguë du processus d'ischémie reperfusion cérébrale, sous tendant la nécessité de se

tourner vers des stratégies thérapeutiques à effets pléiotropes sur les différents niveaux constitués par le compartiment vasculaire, glial et neuronal.

La paroi vasculaire cérébrale constituant le compartiment à l'origine de la pathogénie de l'ischémie cérébrale, nous avons développé au sein du laboratoire, un axe de recherche dévolu à l'implication de celle-ci dans le processus d'ischémie reperfusion cérébrale en la définissant comme cible thérapeutique potentielle dans la recherche de traitements neuroprotecteurs. Elle est en effet responsable de la diversité et de la localisation de l'infarctus en fonction du territoire vasculaire impliqué, pour lequel les symptômes et les déficits neurologiques, définis sous le syndrome de focalisation, sont plus ou moins sévères et conduisent à un handicap particulier. L'étroite relation entre les influences du tissu neuro-glial qu'ils soient d'origine métabolique ou nerveuse, et la régulation du débit sanguin cérébral comme c'est le cas dans le mécanisme de l'hyperémie fonctionnelle, explique le rôle physiologique fondamental de la paroi vasculaire dans le maintien de la survie du tissu neuro-glial, pouvant contribuer à l'extension des lésions ischémiques et au handicap consécutif à l'ischémie cérébrale.

Notre travail s'est donc fortement impliqué dans l'étude du muscle lisse et sa relation étroite avec le compartiment endothélial, en se focalisant sur les altérations électrophysiologiques post-ischémiques des canaux potassiques qui jouent un rôle pivot dans le contrôle du tonus cérébrovasculaire. Celles-ci sont ici reliées d'une part aux propriétés mécaniques du vaisseau et d'autre part aux lésions cérébrales reflétées par des déficits comportementaux qui s'établissent en phase post-ischémique, que nous avons évalués par l'intermédiaire de tests comportementaux moteurs et sensori-moteurs. L'ensemble de ces fonctions ont ainsi été étudiées dans la phase aiguë et subaiguë du processus d'ischémie reperfusion cérébrale, dégageant en définitive la notion de plasticité s'établissant aux différents niveaux étudiés, sur laquelle il serait potentiellement possible d'agir favorablement dans un cadre thérapeutique.

Dans le but d'exposer au mieux ces différentes composantes cérébro-vasculaires, les caractéristiques générales du tissu nerveux et de la vascularisation cérébrale qui assure au final, par l'intermédiaire du débit sanguin cérébral, l'approvisionnement indispensable au fonctionnement du tissu cérébral seront abordées. Les caractéristiques du muscle lisse vasculaire seront ensuite présentées en rendant compte d'une part du rôle central joué par les canaux potassiques vasculaires et d'autre part des multiples influences complexes qu'ils

présentent avec le tissu cérébral. Enfin, les résultats de nos travaux personnels relatifs à ces différentes approches seront exposés puis discutés dans le cadre de l'implication potentielle des canaux potassiques dans la plasticité cérébrale.

Généralités

I. Le système nerveux

Le système nerveux permet la perception des informations extérieures ou internes de l'organisme. Il reçoit des informations de tous les organes qu'il intègre et mémorise au niveau supérieur. Il est responsable du mouvement volontaire et involontaire (réflexe) et contrôle aussi de nombreuses fonctions végétatives en coordination avec le système endocrinien. Ces différentes fonctions sont assurées grâce à certaines propriétés des cellules neuronales et gliales qui le composent, d'excitabilité, de conductibilité et de communicabilité. Il est constitué de deux entités distinctes, anatomiquement et fonctionnellement, le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP).

I.A. Organisation du Système Nerveux Central

Le SNC, composé de l'encéphale et de la moelle épinière, est le centre de régulation et d'intégration du système nerveux. Il intègre l'information sensorielle qui lui parvient et élabore des réponses motrices fondées sur l'expérience, les réflexes et les conditions ambiantes.

L'encéphale peut être subdivisé en différentes régions distinguant les hémisphères cérébraux, le diencephale, le cervelet, et le tronc cérébral (mésencéphale, pont et bulbe rachidien) (**Figure 1**).

I.A.1. L'encéphale

- Les hémisphères cérébraux composent la partie supérieure de l'encéphale et représentent environ 80% de sa masse. Leur surface, formant le cortex cérébral, est parcourue de saillies de tissus appelées circonvolutions, qui sont séparées par des rainures superficielles (les sillons) et profondes (les fissures). Siège de la conscience, il est formé d'une couche de substance grise de quelques millimètres d'épaisseur, constitué de corps cellulaires de neurones, de dendrites et d'axones amyélinisés.
- Le diencephale, situé sous le cortex cérébral, comporte des centres d'intégration (le thalamus, l'hypothalamus et l'épithalamus).
- Le cervelet, centre nerveux régulateur de la fonction motrice, au sens large, reçoit des informations de tous les segments du névraxe (cerveau, moelle épinière et tronc cérébral).
- Le tronc cérébral, composé du mésencéphale, du pont et du bulbe rachidien, est formé de substance blanche contenant des amas de matière grise (noyaux). Il assure le contrôle de l'éveil et de certaines fonctions vitales (respiration, régulation de la

fréquence cardiaque, température corporelle). Douze paires de nerfs crâniens partent du tronc cérébral et sont destinés au contrôle de la tête et du cou, en particulier des organes sensoriels.

La fissure longitudinale du cerveau sépare les deux hémisphères cérébraux et des sillons divisent la surface corticale de chaque hémisphère en 5 lobes, chacun étant spécifiquement dévolu à des fonctions particulières (**Figure 1**) :

1. Le lobe frontal assure les fonctions de l'intelligence, de planification, de coordination, de réalisation de séquences motrices.
2. Le lobe pariétal regroupe les fonctions de lecture, de sensibilité nerveuse et de mémoire visuospatiale.
3. Le lobe occipital intègre et analyse les informations visuelles.
4. Le lobe temporal régit les stimuli olfactifs et auditifs ainsi que certaines fonctions de mémoire
5. Le lobe insulaire, situé anatomiquement plus en profondeur, est impliqué dans l'intégration des informations et des émotions.

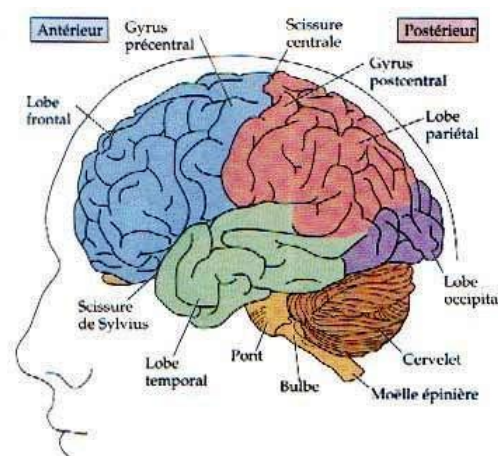


Figure 1: Organisation générale de l'encéphale

I.A.2. Les méninges

Le SNC est protégé par 3 membranes appelées méninges, constituées de l'extérieur vers l'intérieur de la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. Ces membranes recouvrent et protègent le SNC et les vaisseaux sanguins (**Figure 2**).

La dure-mère est la plus résistante des méninges. Elle est constituée de 2 feuillets soudés, sauf en quelques endroits où ils délimitent les sinus de la dure-mère (sinus veineux), qui recueillent le sang veineux de l'encéphale et l'envoient dans les veines jugulaires du cou.

En dessous se trouve la membrane arachnoïdienne qui constitue une enveloppe souple. Elle est rattachée à la pie-mère, la méninge la plus profonde, par des prolongements filamenteux enchevêtrés. A ce niveau se forme la cavité subarachnoïdienne remplie de liquide céphalo-rachidien où sont disposés les gros vaisseaux sanguins telles que les artères piales qui desservent le tissu nerveux de l'encéphale.

La pie-mère est une fine membrane composée de tissu conjonctif adhérant fortement à la surface du cerveau et qui en épouse tous les gyrus et les sillons. Elle est parcourue d'un grand nombre de minuscules vaisseaux sanguins.

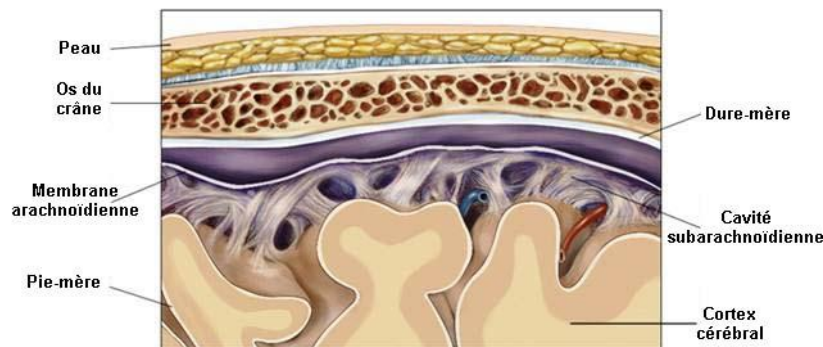


Figure 2: Les méninges

I.A.3. La moelle épinière

La moelle épinière, enfermée dans la colonne vertébrale et rattachée au tronc cérébral, constitue la voie principale de transfert bidirectionnel de l'information nerveuse entre la peau, les articulations et les muscles jusqu'au cerveau. De la moelle épinière partent des fibres nerveuses qui se réunissent pour former, au niveau de chaque vertèbre, les racines dorsales et ventrales. Les racines dorsales sont constituées de fibres sensorielles dont les corps cellulaires sont regroupés dans le ganglion rachidien localisé le long de ces racines dorsales. Les racines ventrales comprennent exclusivement des fibres motrices dont les corps cellulaires sont localisés dans la région ventrale ou latérale de la moelle. Les corps cellulaires sont localisés dans la région centrale de la moelle, formant une substance grise, tandis que les fibres nerveuses myélinisées de communication (ascendantes sensorielles et descendantes motrices) sont localisées en périphérie et constituent la substance blanche.

I.B. Organisation du Système Nerveux Périphérique

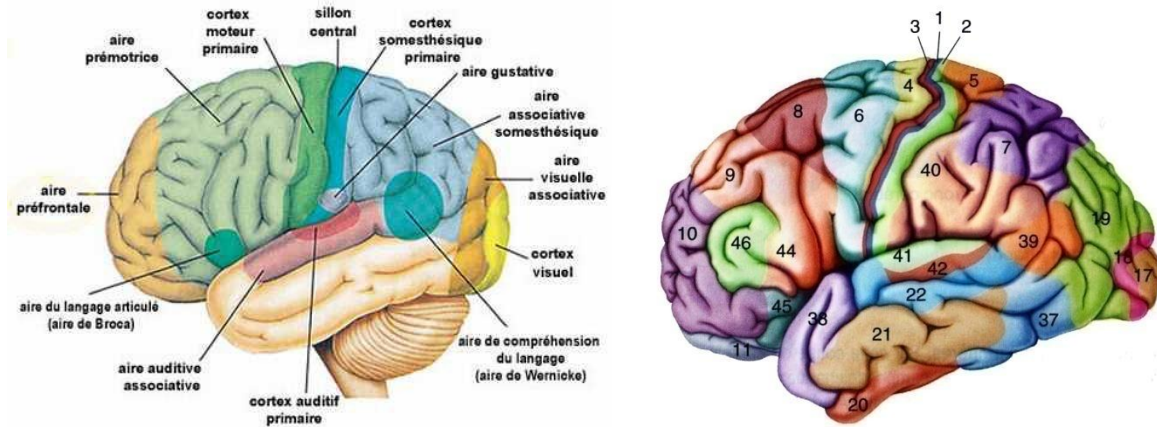
Le SNP est formé principalement des nerfs issus de l'encéphale et de la moelle épinière qui sont de véritables lignes de communication reliant l'organisme entier au SNC. D'un point de vue fonctionnel, il comprend deux types de voies :

- La voie sensitive ou afférente, composée de neurofibres qui transportent vers le SNC les influx provenant des récepteurs sensoriels disséminés dans l'organisme. Cette voie renseigne constamment le SNC sur les événements qui se déroulent tant à l'intérieur qu'à l'extérieur de l'organisme.
- La voie motrice ou efférente, composée de neurofibres qui transmettent aux organes effecteurs les influx provenant du SNC. Cette voie déclenche une réponse motrice adaptée à l'événement et est subdivisée en deux versants :
 - Le système nerveux volontaire (somatique), composé de neurofibres motrices somatiques qui acheminent les influx nerveux du SNC aux muscles squelettiques. Il permet d'exercer une maîtrise consciente sur ces muscles.
 - Le système nerveux autonome (involontaire), composé de neurofibres viscérales qui régulent notamment l'activité des muscles lisses des vaisseaux sanguins, du muscle cardiaque et des glandes. Il comprend deux subdivisions fonctionnelles :
 - le système nerveux sympathique qui se manifeste lorsque nous sommes excités, effrayés ou menacés.
 - le système nerveux parasympathique qui s'active surtout dans les situations neutres, associées notamment au repos et à la digestion.

I.C. Voies nerveuses impliquées dans la somesthésie et la motricité volontaire

Fonctionnellement parlant, le cortex cérébral peut être divisé selon 52 aires corticales appelées aires de Brodmann. Certaines fonctions motrices et sensibles sont en effet reliées à l'activité d'aires corticales spécifiques. Toutefois, plusieurs fonctions mentales supérieures (la mémoire et le langage par exemple) semblent résulter du chevauchement des fonctions de ces différentes aires corticales (**Figure 3**).

Le cortex cérébral renferme 3 types d'aires fonctionnelles : les aires motrices qui président à la fonction motrice volontaire, les aires sensibles, qui permettent les perceptions sensorielles somatiques et autonomes, et les aires associatives, qui servent principalement à intégrer les diverses informations sensorielles afin d'envoyer des commandes motrices aux effecteurs musculaires et glandulaires. Cependant, aucune aire fonctionnelle du cortex n'agit isolément, le comportement conscient faisant intervenir d'une façon ou d'une autre l'ensemble du cortex.



Cortex somesthésique et moteur

Aires corticales de Brodmann

(Bear et coll, 2002)

Figure 3: Les différentes aires fonctionnelles du cortex

I.C.1. La somesthésie

La sensibilité mécanique cutanée est permise par la présence de récepteurs au niveau périphérique qui selon la nature du stimulus, est intégré par des récepteurs spécifiques puis codé en influx nerveux. Les récepteurs somesthésiques sont innervés par des fibres conduisant plus ou moins rapidement l'information vers différents territoires de la moelle épinière. Celle-ci représente le premier niveau d'intégration nerveuse, dans le sens où elle intervient dans les mécanismes de réflexes, et dans la transmission des informations vers les étages supérieurs du système nerveux central.

Après avoir parcouru des chemins nerveux complexes selon la nature et la localisation du stimulus perçu, chaque région cérébrale traite les informations provenant d'une région cutanée controlatérale précise (notion de somatotopie). Cette somatotopie est particulièrement marquée dans le cortex somesthésique primaire (aires 1, 2, 3 de Brodmann), où chaque région de la surface cutanée est représentée en fonction de sa densité en récepteurs (**Figure 3**). Une intégration nerveuse du stimulus sensoriel est ensuite réalisée au sein des différentes aires somesthésiques.

I.C.2. Contrôle du mouvement volontaire.

La genèse d'un mouvement volontaire fait appel à de nombreux processus (identification du but à atteindre, programmation des contractions musculaires, exécution du mouvement final) qui impliquent un large éventail de structures nerveuses, corticales et sous corticales.

Le mouvement volontaire est commandé à partir de plusieurs territoires corticaux. L'aire 4 dans la classification de Brodmann (cortex moteur primaire) est organisée de telle

façon que chaque point de sa surface commande la contraction isolée d'un muscle particulier situé dans l'hémicorps controlatéral (**Figure 3**). D'autres aires motrices (cortex prémoteur, aire motrice supplémentaire : toutes deux formant l'aire 6) sont aussi impliquées dans la réalisation d'une commande motrice. L'aire prémotrice, située en position plus latérale, provoque par des contractions séquentielles et coordonnées de plusieurs muscles, le mouvement de tout un membre. Il apparaît en fait que ces 3 aires sont hiérarchisées. On peut en effet associer l'aire primaire à l'exécution d'un mouvement et les aires prémotrice et motrice supplémentaire à sa programmation. Les aires motrices corticales peuvent agir sur les noyaux moteurs de la moelle épinière et du tronc cérébral par au moins deux grands systèmes descendants (**Figure 4**)

- Les voies cortico-spinales et cortico-bulbaire mettant directement le cortex cérébral en relation avec les structures motrices basses controlatérales.
- La voie cortico-rubro spinale impliquant un relais intermédiaire dans une structure mésencéphalique, le noyau rouge, qui projette ensuite sur les noyaux moteurs controlatéraux de la moelle épinière.

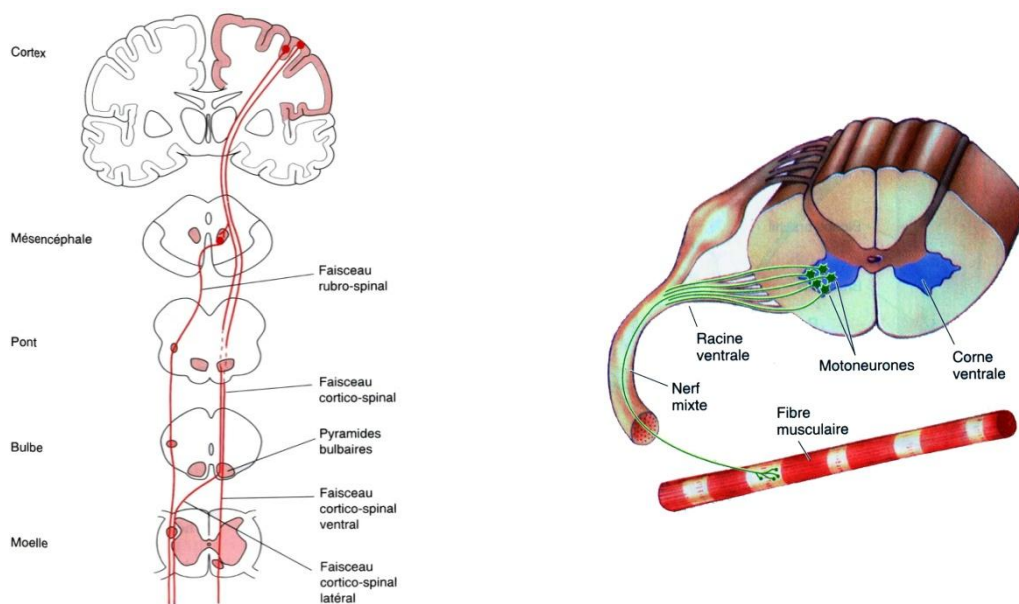


Figure 4: Voies motrices impliquées dans le contrôle du mouvement volontaire (Richard et Orsal, 2001)

La connexion entre les fibres cortico-spinales ou rubro-spinales et les motoneurones (α) de la moelle épinière se fait le plus souvent par l'intermédiaire d'interneurones. Les motoneurones α innervent ensuite les fibres musculaires squelettiques. A leur arrivée dans le muscle concerné, les fibres α se ramifient plusieurs fois pour établir des contacts synaptiques dans la plaque motrice avec plusieurs fibres musculaires, l'ensemble

constituant une unité motrice. Ce contact synaptique, appelé jonction neuromusculaire, fait intervenir la libération d'acétylcholine, dont la fixation sur le récepteur post-synaptique permet la formation d'un potentiel de plaque motrice. Celui-ci entraînant la formation d'un potentiel d'action, à l'origine de la contraction musculaire.

I.D. Caractéristiques du tissu neuro-glial

I.D.1. Les neurones

La plupart des neurones possèdent quatre éléments constitutifs : le soma, les dendrites, un seul axone et les terminaisons synaptiques. Les dendrites et le soma reçoivent l'information venant d'autres neurones et représentent le pôle récepteur du neurone. C'est au niveau du segment initial de l'axone, que sont générés les potentiels d'action, support de l'influx nerveux, en réponse aux informations synaptiques transmises par l'arbre somato-dendritique. Ces influx sont transportés le long de l'axone jusqu'aux terminaisons synaptiques qui entrent en contact avec d'autres neurones ou effecteurs (**Figure 5**).

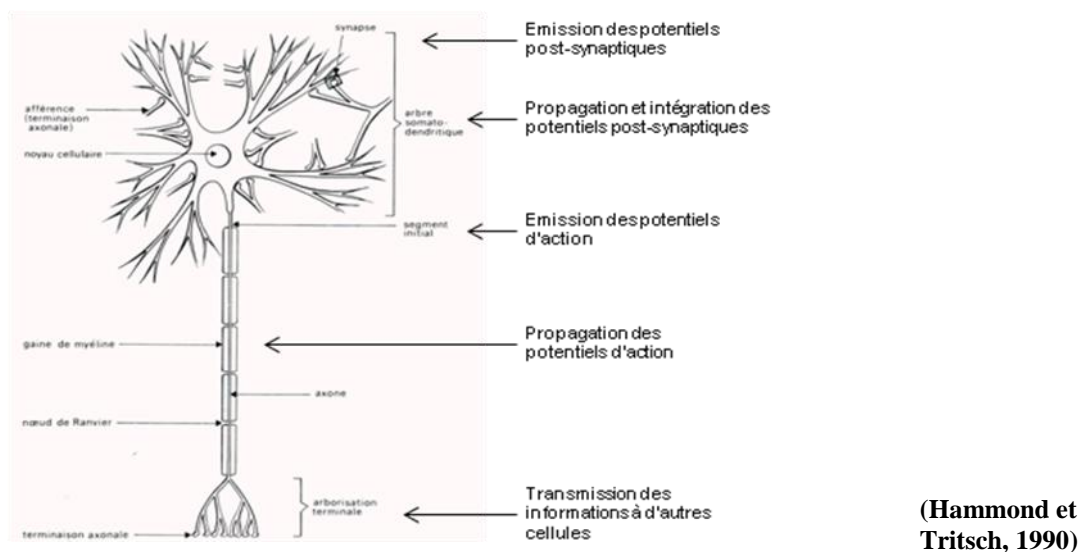
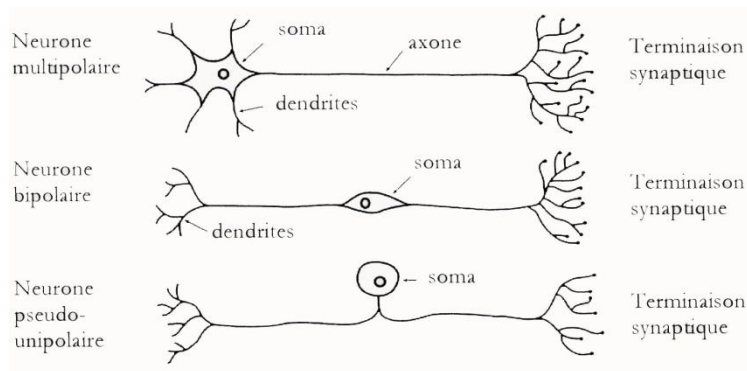


Figure 5: Schéma explicatif de la polarité des neurones: de l'émission d'un potentiel post-synaptique à l'élaboration et la propagation d'un potentiel d'action

I.D.1.a. Le soma

Tous les prolongements neuritiques (dendritiques et axonaux) partent du corps cellulaire (soma). Ainsi, les neurones peuvent être classés, selon le nombre de prolongements, en multipolaires, bipolaires et pseudo-unipolaires (**Figure 6**).



(Pritchard et Alloway, 2002)

Figure 6: Classification des neurones selon leurs prolongements

Le soma est le centre métabolique du neurone : il a en effet la particularité d'être le lieu essentiel de la synthèse des macromolécules car il est le seul compartiment renfermant tous les organites nécessaires à cette synthèse. Il renferme les mêmes organites intracellulaires que les autres cellules de l'organisme. Le noyau est habituellement volumineux, sphérique et situé au centre du corps cellulaire. Il possède un seul nucléole de taille importante qui reflète la forte activité de synthèse protéique du neurone. Il renferme aussi un réticulum endoplasmique abondant lié à la forte synthèse protéique, beaucoup de ribosomes individualisés ou sous forme de polysomes, une collection d'appareils de Golgi dispersés à travers le cytoplasme et de nombreuses mitochondries indispensables aux besoins énergétiques du neurone. Des faisceaux de microtubules et de neurofibrilles, des groupes de filaments intermédiaires (neurofilaments) forment un réseau complexe et jouent un rôle important dans le transport intracellulaire ainsi que dans le maintien de la forme et de l'intégrité de la cellule.

I.D.1.b. Les dendrites

Les dendrites prennent naissance à partir du corps cellulaire des neurones. Leur nombre est variable d'une cellule à l'autre et elles se ramifient jusqu'à parfois former un réseau dense en arbre dendritique. Les dendrites fournissent une surface réceptive servant à intégrer les signaux provenant d'autres neurones. Leur contour peut être irrégulier, car ils possèdent à leur surface de petites proéminences bourgeonnantes appelées épines dendritiques spécialisées dans la réception des signaux post synaptiques. La communication entre neurones a lieu sur ces sites spécifiques de l'arborisation dendritique qui sont appelés synapses.

Les dendrites et le soma reçoivent de très nombreux contacts synaptiques venant d'autres neurones et constituent la principale surface de réception du neurone. Ils intègrent les

messages afférents et génèrent, en réponse à ces messages, des signaux électriques (potentiel post-synaptiques).

I.D.1.c. L'axone

L'axone est un prolongement qui naît du soma et qui peut s'étendre sur de grandes distances avant d'entrer en contact avec d'autres neurones. Il peut donner des branches collatérales qui en général quittent l'axone à angle droit. Sa surface est lisse et son diamètre reste constant. La partie terminale de l'axone où ses branches se terminent en petites dilatations appelées boutons terminaux ou synaptiques sont étroitement appliquées contre le corps cellulaire ou les dendrites du neurone récepteur. L'axone et ses collatérales peuvent également présenter le long de leur trajet des renflements ou varicosités qui établissent des contacts synaptiques avec les cellules cibles : les boutons en passant. La fonction principale de l'axone est de conduire les influx électrochimiques du soma vers les terminaisons synaptiques, sans perte d'amplitude du signal. Cette conduction est réalisée grâce à la présence, dans les membranes plasmiques des neurones, de protéines ayant la capacité de laisser passer sélectivement certains ions : les canaux ioniques. L'axone est parfois entouré d'une gaine de myéline qui permet une conduction saltatoire et rapide du potentiel d'action.

I.D.1.d. Les terminaisons synaptiques

Les terminaisons synaptiques sont des structures spécialisées qui permettent aux neurones de communiquer entre eux. Les boutons synaptiques renferment des mitochondries, des vésicules synaptiques, des enzymes et d'autres constituants neurochimiques. Les vésicules synaptiques contiennent également des molécules de neurotransmetteurs qui seront libérés dans la fente synaptique grâce à l'entrée d'ions Ca^{2+} déclenchée par l'arrivée d'un potentiel d'action. Ces neurotransmetteurs vont alors se fixer sur des récepteurs ionotropiques (récepteurs canaux) ou métabotropiques spécifiques de la membrane post-synaptique et permettre la formation d'un potentiel post-synaptique dans le neurone cible au niveau de l'arbre somato-dendritique. De façon concomitante, les molécules de neurotransmetteurs présentes dans la fente synaptique sont recaptées par l'élément présynaptique et la membrane plasmique présynaptique est recyclée. Les synapses peuvent être axo-dendritiques, axo-somatiques ou bien encore axo-axoniques.

I.D.1.e. Les besoins énergétiques des neurones

L'activité neuronale est déterminée par l'activité électrique et synaptique, qui est la résultante de la formation de potentiel d'action, de la libération de neurotransmetteurs et de la réponse électrique et chimique de l'élément post synaptique. La majorité des besoins

énergétiques liée à cette activité provient majoritairement de la restauration des gradients ioniques transmembranaires qui sont transitoirement déséquilibrés par les courants sous-tendant les potentiels d'action et par les potentiels post synaptiques.

L'oxygène et le glucose, qui est le substrat énergétique exclusif des neurones en condition normale sont apportés par le sang circulant au sein de la circulation cérébrale décrite par la suite. La vitesse du métabolisme des neurones étant exceptionnellement élevée, ils requièrent un approvisionnement continu et constant et ne peuvent survivre plus de quelques minutes sans leur besoins énergétiques.

I.D.2. Les cellules gliales

Elles occupent l'espace libre entre les neurones et leurs prolongements et s'interposent entre les cellules nerveuses et les vaisseaux sanguins. Pour cette raison, on leur a longtemps attribué un rôle de soutien. Mais elles participent à beaucoup d'autres fonctions majeures et nécessaires à la physiologie du système nerveux central. Les cellules gliales ne transmettent pas de signal électrique mais sont indispensables au maintien de la composition du milieu dans lequel travaillent les neurones. En fonction de leurs aspects structuraux et fonctionnels, elles sont classées en 4 catégories.

I.D.2.a. Les astrocytes

Les cellules gliales les plus nombreuses sont les astrocytes qui contribuent au fonctionnement cérébral en étroite synergie avec la fonction neuronale. Les astrocytes représentent l'essentiel de l'environnement dans lequel baignent les neurones. A titre d'exemple, les astrocytes de la substance grise présentent deux types de prolongements :

- Les prolongements perisynaptiques fins qui enveloppent les synapses. A ce niveau sont exprimées des protéines spécifiques qui captent de nombreux neurotransmetteurs et autres molécules agissant dans l'espace synaptique. Par leur action, les astrocytes permettent la régulation des taux de neurotransmetteurs et d'autres molécules permettant la transmission de l'influx nerveux. Ils peuvent aussi libérer des agents neuroactifs tels que des stéroïdes, des neuropeptides et des facteurs de croissance. Le mécanisme de libération du glutamate par les astrocytes suite à l'activité synaptique apparaît être un des mécanismes qui permet de réguler la transmission synaptique (Nedergaard et coll, 2003).
- Les prolongements de plus grand diamètre qui interagissent avec les parois vasculaires, couvrant la quasi-totalité de la paroi vasculaire composée de cellules endothéliales, de péricytes ou de cellules musculaires lisses. Au niveau de

l'extrémité de ces prolongements, aussi appelés "pieds astrocytaires", sont exprimés plusieurs types de protéines spécialisées, dont notamment des transporteurs de glucose qui facilitent un transport rapide permettant de répondre rapidement à la demande métabolique des neurones. Deux autres protéines spécifiques sont aussi exprimées : l'aquaporine 4 et la connexine 43, permettant dans ce dernier cas un contact direct des astrocytes avec le compartiment vasculaire.

I.D.2.b. Les autres types de cellules gliales

Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann isolent la plupart des axones par la myéline, respectivement localisés au sein du système nerveux central et périphérique. Au niveau des nœuds de Ranvier, la gaine de myéline est discontinue sur une petite longueur où la membrane de l'axone se trouve exposée, permettant par la propagation saltatoire, l'accélération de la transmission de l'influx nerveux.

D'autres cellules gliales sont présentes dans le cerveau. Les cellules épendymaires forment un épithélium à la surface des cavités ventriculaires et pourraient jouer un rôle dans le contrôle du sens de la migration de certaines cellules pendant le développement cérébral. Les cellules microgliales (formant la microglie) sont des petites cellules très ramifiées qui interviennent dans les processus immunitaires du système nerveux. Elles jouent un rôle de phagocytes pour éliminer les débris laissés par les neurones et les cellules gliales en voie de dégénérescence.

II. Les territoires artériels cérébraux

Le cerveau, dépourvu de réserves d'oxygène et de substrats énergétiques, est fortement dépendant des apports extérieurs. Afin d'assurer toutes ses fonctions, l'encéphale a besoin d'une irrigation constante et soutenue avec un débit sanguin cérébral (DSC) qui est en moyenne de 50 ml/min/100g de tissu cérébral chez l'adulte (Tatu *et coll*, 1998). Le système vasculaire cérébral, qui représente 15% de la circulation générale, permet d'assurer cette fonction d'apport tout en débarrassant par le retour veineux les métabolites produits par l'activité du tissu cérébral (CO₂, lactate...). Le système est tétrapodique, c'est-à-dire qu'il comporte quatre pédicules s'organisant en deux systèmes artériels :

- La carotide primitive droite et la carotide primitive gauche, toutes deux formant le système carotidien.
- La vertébrale droite et la vertébrale gauche, qui en se réunissant, forme le système vertébro-basilaire.

Ces deux systèmes artériels se rejoignent par l'intermédiaire d'artères communicantes situées à la base du cerveau pour former le polygone de Willis. Les différentes artères cérébrales ainsi organisées irriguent chacune une zone bien particulière du cerveau correspondant respectivement aux nombreux territoires artériels cérébraux. Seront particulièrement décrits ici les territoires de l'artère cérébrale moyenne (territoire sylvien), de l'artère cérébrale antérieure et de l'artère cérébrale postérieure (**Figure 7**).

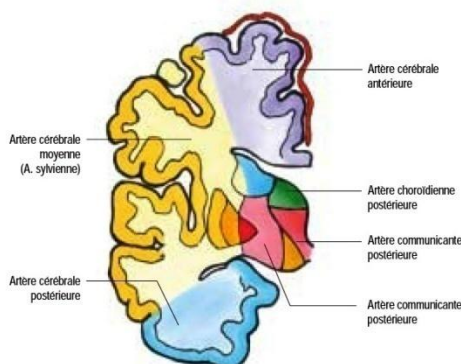


Figure 7: Représentation schématique des principaux territoires artériels du cerveau

Un système de drainage veineux permet le retour du sang et s'organise en différents sinus dont les diamètres augmentent à mesure qu'ils reçoivent les veines cérébrales. Les sinus latéraux recueillent l'ensemble des grandes voies veineuses pour former finalement les veines jugulaires internes qui s'orientent progressivement vers le cœur.

II.A. Le système carotidien

Les artères carotides communes (primitives) n'ont pas la même origine. En effet, la droite naît du tronc brachio-céphalique, tandis que la gauche est la deuxième branche de la crosse de l'aorte. Les artères carotides communes montent sur les côtés du cou et, à la limite supérieure du larynx, chacune donne ses deux branches principales au niveau de la bifurcation carotidienne, l'artère carotide externe et l'artère carotide interne.

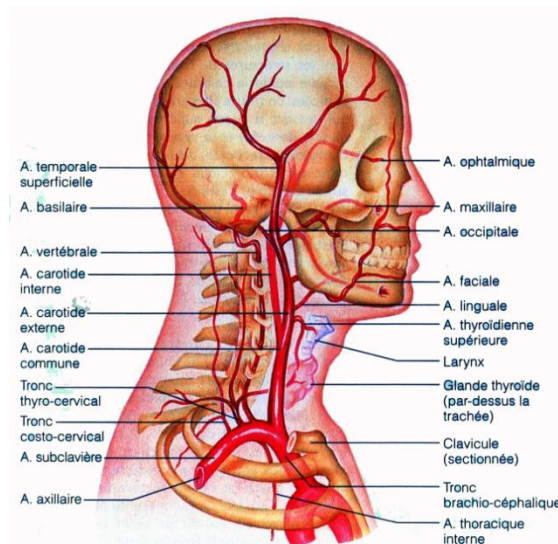


Figure 8: Le système carotidien

Les artères carotides externes desservent la majeure partie des tissus de la tête, à l'exception de l'encéphale et des orbites. En montant, chacune émet des ramifications vers la glande thyroïde et le larynx (artère thyroïdienne supérieure), la langue (artère linguale), la peau et les muscles de la partie antérieure du visage (artère faciale) et la partie postérieure du cuir chevelu (artère occipitale). Chaque artère carotide externe se termine en donnant naissance à l'artère temporale superficielle, qui irrigue la glande parotide et la majeure partie du cuir chevelu, et à l'artère maxillaire, qui irrigue les mâchoires, les muscles de la mastication, les dents et la cavité nasale (**Figure 8**).

Les artères carotides internes, plus grosses que les précédentes, ont une destinée intra-crânienne et irriguent les orbites ainsi que 80% du cerveau. Une fois à l'intérieur du crâne, chacune donne une collatérale en avant, l'artère ophtalmique, et en arrière la communicante postérieure et la choroïdienne antérieure. Puis l'artère carotide interne se divise en ses deux terminales, l'artère cérébrale antérieure et l'artère cérébrale moyenne (sylvienne).

L'artère cérébrale moyenne est la plus volumineuse et la plus complexe des artères cérébrales. Son trajet a été subdivisé en quatre segments (Fischer, 1991). Le premier segment, basal et appelé M1, s'étend de son origine au niveau de la carotide interne jusqu'à

son entrée dans la vallée hémisphérique au niveau du lobe insulaire. Dans ce segment, l'artère cérébrale moyenne se dirige latéralement et envoie des branches centrales (artères lenticulo-striées) perforantes qui pénètrent l'hémisphère en profondeur. Elles irriguent le territoire sylvien profond correspondant, incluant le striatum. Ce territoire concerne les régions cérébrales du noyau lenticulaire et la capsule interne dans le bras de laquelle passe le faisceau pyramidal. Puis le segment M1 se divise en deux branches superficielles (segment M2) pour entrer dans la vallée hémisphérique qu'il parcourt d'avant en arrière. Ce segment donne naissance aux branches corticales (segments M3 et M4) qui irriguent le territoire sylvien superficiel correspondant. Il concerne les lobes frontaux, pariétaux et temporaux dans leur partie externe (cortex et substance blanche sous-jacente) (**Figure 9**).

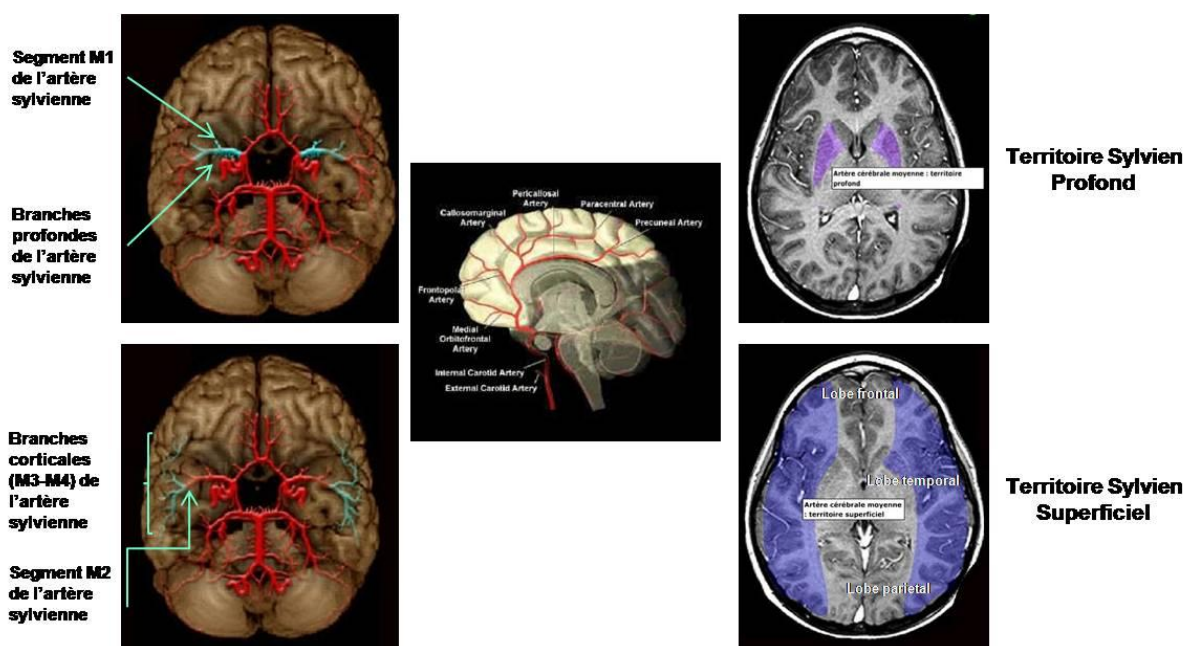


Figure 9: Les ramifications de l'artère cérébrale moyenne et ses territoires artériels correspondants

L'artère cérébrale antérieure naît de la division médiale de l'artère carotide interne au niveau de sa terminaison, et possède un territoire à la fois diencephalique et cortical. Son trajet a également été séparé en 5 segments de Fischer. Le segment pré-communicant A1 s'anastomose à l'entrée du sillon inter-hémisphérique avec l'artère cérébrale antérieure opposée par l'intermédiaire de l'artère communicante antérieure qui participe au polygone de Willis. Au niveau de son segment A1, elle donne l'artère de Heubner responsable de la vascularisation du noyau caudé et correspondant au territoire artériel profond de l'artère cérébrale antérieure (**Figure 10**).

Au-delà de cette jonction communicante, l'artère cérébrale poursuit son trajet par les segments distaux (pré calleux A3 et supra calleux A4, A5) débutant par le segment A2 post-communicant. Tout en se dirigeant vers l'arrière du cerveau où elle donne l'artère péri-

callosus postérieure qui s'anastomose finalement avec l'artère cérébrale postérieure ipsilatérale, chaque artère cérébrale antérieure forme des collatérales corticales qui irriguent la face interne d'un hémisphère cérébral correspondant au territoire superficiel de l'artère cérébrale antérieure (**Figure 10**).

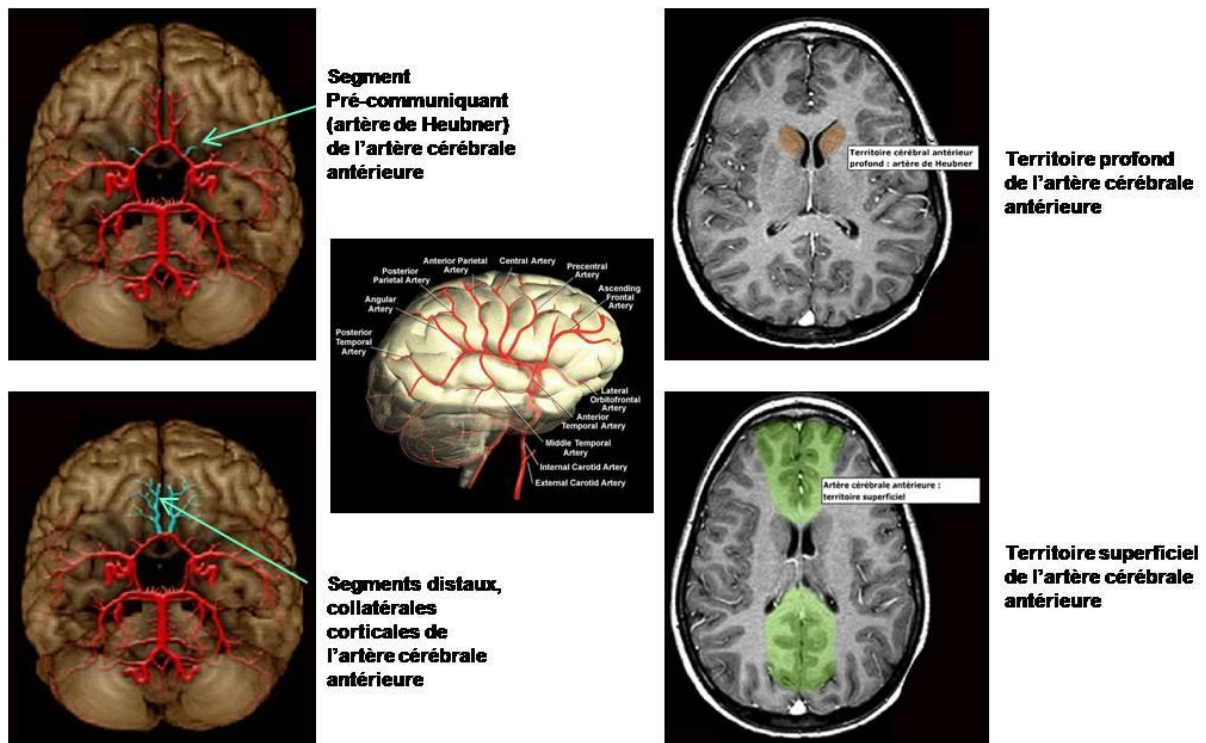


Figure 10: Les ramifications de l'artère cérébrale antérieure et ses territoires artériels correspondants

II.B. Le système vertébro-basilaire

Les artères vertébrales qui naissent des artères sous-clavières, assurent un apport sanguin sur l'arrière du crâne. Elles montent à travers les trous transversaires des vertèbres cervicales et elles entrent dans le crâne par le foramen magnum. En chemin, elles émettent des branches collatérales (artères cérébelleuses postéro-inférieures) destinées à l'irrigation des territoires de la moelle, du bulbe et du cervelet. Les artères vertébrales droite et gauche s'unissent pour former l'artère basilaire qui a un trajet rectiligne. Au niveau de celle-ci (tronc basilaire) naissent des branches collatérales qui constituent les artères cérébelleuses moyennes et supérieures assurant l'irrigation respective de la partie moyenne et supérieure du cervelet ainsi que du tronc cérébral (**Figure 11**).

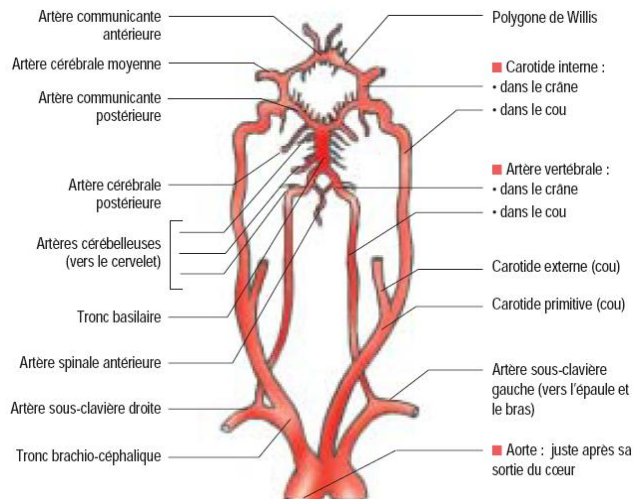


Figure 11: Représentation schématique des artères du cerveau

Les artères cérébrales postérieures sont les branches terminales du tronc basilaire, elles enserrant les pédoncules cérébraux puis s'anastomosent avec les artères communicantes postérieures issues des artères carotides pour constituer ainsi le segment postérieur du polygone de Willis. Les artères cérébrales postérieures sont divisées en plusieurs segments. Le segment pré-communicant (P1), très court, se dirige en avant puis latéralement jusqu'à la jonction avec l'artère communicante postérieure. Le segment distal qui fait suite est divisé en une première partie basale P2, puis dans sa partie latérale, une deuxième partie constituée des segments P3 et P4 qui envoient des branches superficielles et profondes dans le cerveau. Leurs branches superficielles irriguent la face inféro-interne des lobes temporaux (hippocampe) et les lobes occipitaux. Leurs branches profondes, de concert avec les branches de l'artère communicante postérieure, irriguent le territoire thalamique (**Figure 11**).

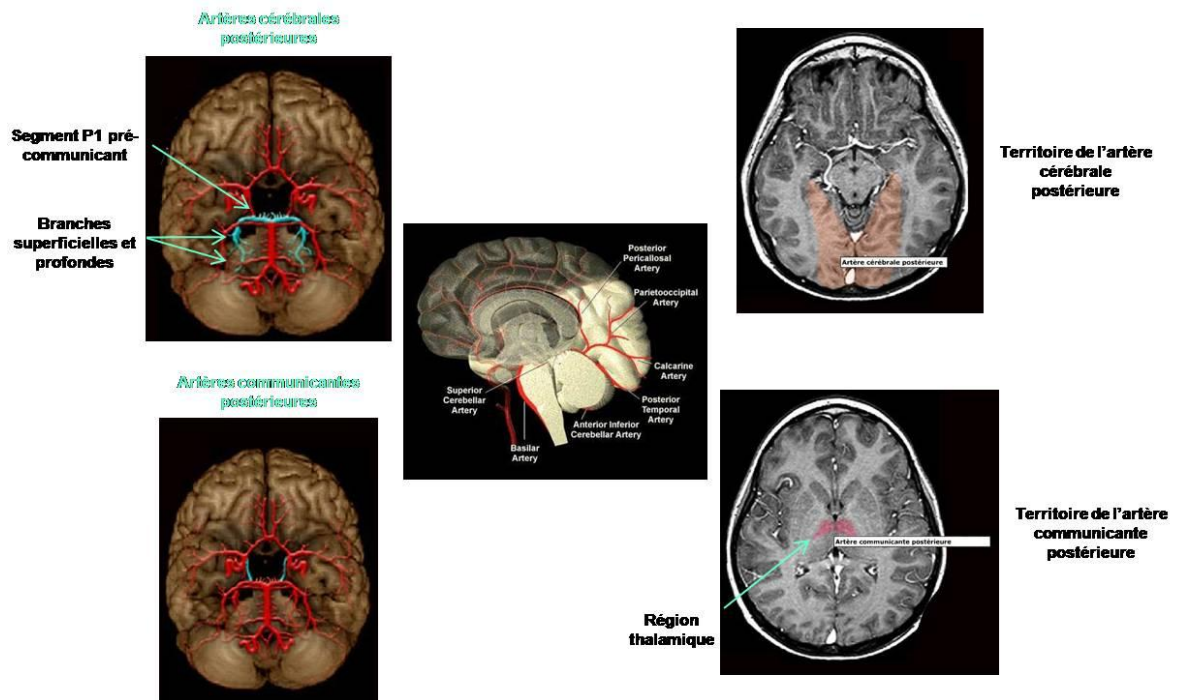


Figure 12: Les artères cérébrales postérieures et communicantes postérieures et leurs territoires artériels respectifs

II.C. Le polygone de Willis

La caractéristique du système artériel encéphalique de l'homme est de posséder des anastomoses susceptibles de fournir des suppléances en cas d'occlusion. Parmi celles-ci, le polygone (cercle) de Willis représente l'anastomose essentielle entre les grands territoires artériels situés sous la face inférieure du cerveau. Il relie, sur l'avant, les deux artères cérébrales antérieures issues des artères carotides internes par l'unique artère communicante antérieure. Il permet, sur l'arrière, de faire la jonction entre le territoire carotidien et le territoire vertébro-basilaire par les deux artères communicantes droite et gauche qui s'anastomose avec les artères cérébrales postérieures (**Figure 13**).

Le polygone de Willis permet d'unir les vaisseaux artériels antérieurs et postérieurs de l'encéphale. Il sert à équilibrer la pression artérielle dans les deux hémisphères cérébraux et donne un accès sanguin supplémentaire au tissu cérébral en cas d'occlusion d'une artère carotide ou vertébrale.

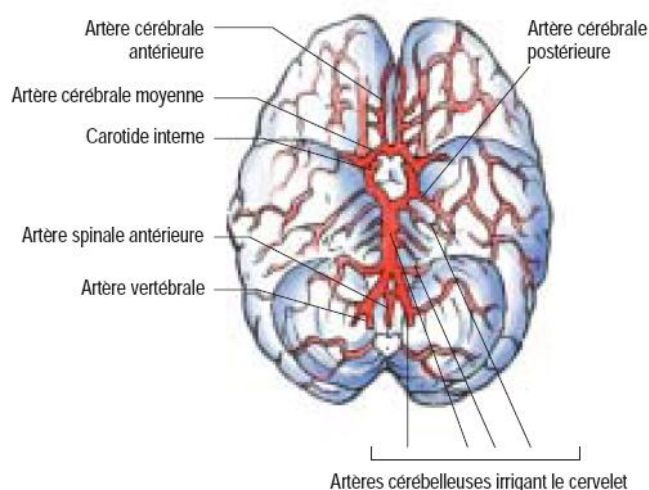


Figure 13: Le polygone de Willis

III. La vascularisation cérébrale

Les vaisseaux sanguins forment un réseau clos qui débutant et aboutissant au cœur permettent d'irriguer l'ensemble des territoires de l'organisme. Il se divise en trois grandes catégories : les artères, les capillaires et les veines. Après la contraction du cœur chassant le sang dans les grosses artères, le sang parcourt en direction de l'encéphale les ramifications artérielles de plus en plus petites jusqu'aux artérioles. Au niveau des artérioles terminales s'établit la microcirculation cérébrale où il atteint les lits capillaires permettant de réaliser les échanges physiologiques entre les cellules. A sa sortie des capillaires, le sang emprunte les veinules, les veines et enfin les grosses veines qui convergent au cœur (**Figure 14**). La paroi des artères et des veines, sauf celles des plus petites, ont une organisation générale commune en 3 couches, ou tuniques, entourant un espace central où circule le sang, la lumière.

La tunique interne, ou intima, est formée d'endothélium, un épithélium pavimenteux simple qui tapisse la lumière de tous les vaisseaux quelque soit leur diamètre. L'endothélium repose sur une membrane basale (couche compacte de matériau extracellulaire) qui contribue à la cohésion structurale de celui-ci. La tunique moyenne, ou média, comprend principalement des cellules musculaires lisses disposées en anneau. Elles s'insèrent entre des lames concentriques élastiques formées principalement d'élastine. Ces lames sont fenestrées permettant le passage de substances régulatrices des cellules endothéliales aux cellules musculaires lisses. La tunique externe, ou adventice, représente une couche de tissu conjonctif riche en collagène et en fibres élastiques.

Les proportions de chaque composant varient selon la fonction du vaisseau. L'endothélium permet ainsi de réduire la friction du flux sanguin sur la paroi vasculaire. Au

niveau de la média, le tissu élastique donne au vaisseau sa capacité de stockage et les fibres musculaires lisses en contrôle le diamètre. La couche conjonctive externe empêche, quant-à-elle, une distension excessive et permet l'ancrage du vaisseau aux tissus voisins.

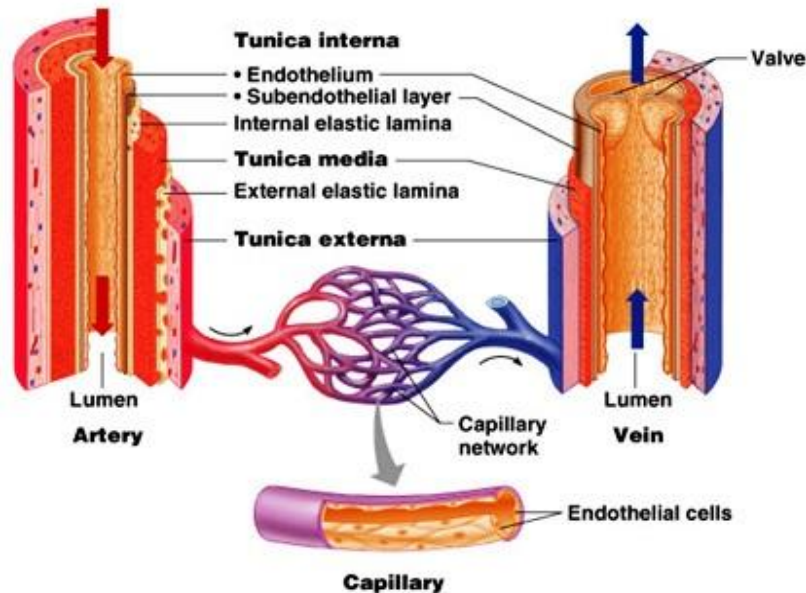


Figure 14: Organisation générale du système vasculaire

Les vaisseaux sanguins, comme tous les organes, sont constitués de cellules qui doivent recevoir des nutriments et de l'oxygène et rejeter des déchets métaboliques. Pour les vaisseaux de petit diamètre, la proximité immédiate du sang circulant permet la réalisation d'échanges directs. Pour les vaisseaux de plus grand diamètre, en plus de cet échange direct, un système de réseau capillaire appelé *vasa vasorum* permet de réaliser les échanges aux cellules les plus éloignées de la lumière du vaisseau, notamment dans la partie externe de la média (**Figure 15**).

Les vaisseaux sont innervés par des fibres nerveuses dont les afférences aboutissent à la limite de la média et de l'adventice. Elles agissent directement sur les cellules musculaires lisses de la couche la plus externe de la média puis la transmission de l'excitation se fait de proche en proche par couplage électrique entre les cellules (**Figure 15**).

III.A. Le réseau artériel cérébral

Les artères élastiques situées près du cœur, ont comme caractéristique majeure d'avoir un grand diamètre et une grande élasticité. Aussi appelées artères conductrices, leur grande richesse en élastine leur donne la propriété de se dilater et de se resserrer passivement selon le volume sanguin éjecté et donc de compenser les grandes fluctuations de pression. Le sang s'écoule alors de manière continue malgré les contractions cardiaques.

Les artères élastiques donnent naissance aux artères moyennes musculaires (distributrices). Elles ont pour rôle d'apporter le sang aux divers organes. Leur tunique moyenne dépasse en épaisseur celle de tous les autres vaisseaux et contient plus de muscles lisses et moins de tissu élastique que celle des artères élastiques. Elles ont ainsi un rôle plus actif dans la vasoconstriction et possèdent des propriétés d'autorégulation. Chacune des faces de leur tunique moyenne porte un feuillet élastique : la limitante élastique externe et interne (ci-dessous).

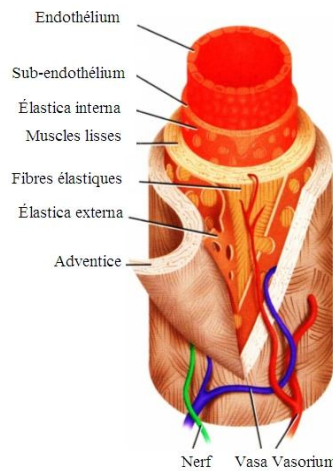


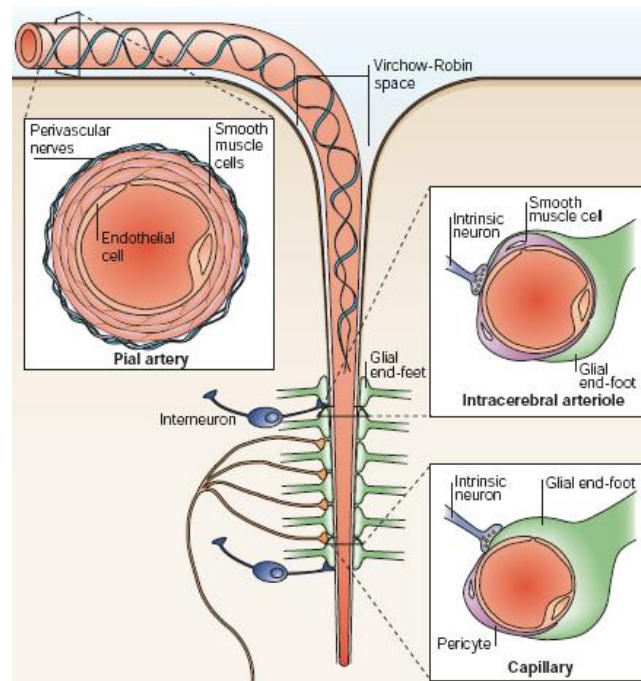
Figure 15: Structure d'une artère

III.B. La microcirculation cérébrale

Les différentes artères cérébrales décrites précédemment possèdent une grande capacité de vasoconstriction et de vasodilatation pour régler le volume de sang adapté aux besoins du territoire cérébral irrigué. Lorsqu'elles passent le polygone de Willis, ces artères cérébrales parcourent la surface du cerveau dans l'espace subarachnoïdien sur la pie-mère (artères piales), puis tout en se ramifiant, elles pénètrent progressivement dans le parenchyme cérébral sous formes d'artères et d'artéριοles pénétrantes (**Figure 16**). Elles présentent alors, sur une courte distance, un espace périvasculaire (espace de Virchow-Robin) rempli de liquide céphalorachidien entre d'une part leur paroi et d'autre part l'intima-pia, couche avasculaire de la pie-mère recouvrant la surface cérébrale. Avec leur petit calibre se situant entre 0,3 mm et 10 μm les artéριοles sont les plus petites artères. Elles sont dotées de trois tuniques, mais leur tunique moyenne est composée principalement de cellules musculaires lisses et de quelques fibres élastiques clairsemées. Les plus petites ne sont constituées que d'une seule couche de cellules musculaires lisses enroulées en spirale autour de l'endothélium. Des péricytes, cellules apparentées aux cellules musculaires lisses possédant aussi des propriétés contractiles, s'intègrent à la paroi vasculaire en quantité croissante et ont un rôle au stade capillaire par la suite.

Au fur et à mesure de leur incursion dans le tissu cérébral, le diamètre des artérioles diminue progressivement et les myocytes interagissent avec les astrocytes, par l'intermédiaire de leurs prolongements (pieds astrocytaires), qui viennent jusqu'à entourer en totalité la paroi vasculaire et les neurones. En condition physiologique, ces différents types cellulaires forment une unité fonctionnelle, neuro-glio-vasculaire qui joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie cellulaire permettant d'allier le fonctionnement des neurones avec un apport métabolique sanguin adapté.

A ce stade se forment les capillaires cérébraux qui s'organisent en réseaux denses (400 capillaires au mm^2). Ce sont les plus petits vaisseaux sanguins avec un calibre de l'ordre de 8 à 10 μm . Leurs parois extrêmement minces sont formées de cellules endothéliales fixées sur la membrane basale dans laquelle sont disposés les péricytes. Dans certains cas, une seule cellule endothéliale constitue l'entière circonférence de la paroi. Ils sont ainsi bien adaptés à leur rôle d'assurer les échanges de substances (gaz, nutriments, hormones) et de déchets entre le sang et les cellules des tissus.



(Iadecola, 2004)

Figure 16: Organisation de la microcirculation cérébrale

La microcirculation cérébrale présente des caractéristiques particulières notamment dans la régulation du débit sanguin. Effectivement, compte tenu de l'organisation différente du muscle lisse au sein de l'arborisation, les artères piales présentent une réactivité vasculaire supérieure à celles des artérioles des capillaires cérébraux. A la différence d'autres organes, le contrôle du débit sanguin cérébral s'effectue ainsi principalement en périphérie du

territoire irrigué, au niveau des artères piales. L'écoulement du sang dans les lits capillaires déterminé par les variations du diamètre des artérioles, bien que sous l'influence de facteurs locaux (stimulus nerveux, chimiques), se trouvent donc sous la dépendance du contrôle réalisé en périphérie du cerveau.

III.C. La régulation de la perméabilité vasculaire par la barrière hémato-encéphalique

Le rôle principal des capillaires cérébraux est d'assurer les échanges de nutriments et de déchets entre le sang et les cellules du tissu nerveux, les autres structures artérielles ou veineuses constituant une barrière infranchissable. Le tissu nerveux de l'encéphale étant, de tous les tissus de l'organisme, celui qui a le plus besoin d'un milieu interne absolument constant, la barrière hémato-encéphalique (BHE) assure cette stabilité en permettant une filtration sélective vis-à-vis du tissu neuroglial.

Le support anatomique de la barrière hémato-encéphalique est le capillaire cérébral qui possède des caractéristiques structurales et métaboliques qui lui sont propres. Une couche de cellules repose sur une membrane basale, ou matrice extracellulaire, composée essentiellement de collagène de type IV, de laminine et de fibronectine. Dans la membrane basale, se trouvent enchâssés des péricytes qui semblent jouer un rôle tant dans le maintien de l'intégrité de la barrière que dans la fonctionnalité de celle-ci par une communication privilégiée avec les cellules endothéliales. Enfin, le capillaire ainsi constitué est entouré d'un manchon ininterrompu de pieds astrocytaires (plus de 85% de la surface des capillaires), qui jouent un rôle dans le transport de l'eau par l'expression de nombreuses aquaporines. La proximité de ces pieds astrocytaires avec les cellules endothéliales au niveau des capillaires et avec les cellules musculaires lisses au niveau des artérioles pénétrantes suggère l'existence d'interactions complexes entre ces différentes cellules qui permettent la régulation de nombreuses fonctions.

III.C.1 Caractéristiques des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique

Les capillaires continus représentent le type majeur de capillaire retrouvé au niveau cérébral et sont les plus imperméables de l'organisme. Les cellules endothéliales possèdent peu de vésicules d'endocytose, limitant ainsi le flux transcellulaire, n'ont pas de fenestrations et sont associées à des jonctions étanches qui diminuent très nettement le flux paracellulaire et transforment l'endothélium en une interface unique entre le sang circulant et le secteur extracellulaire cérébral. Par ailleurs, ces cellules endothéliales sont très riches en

mitochondries, qui apportent l'énergie nécessaire au maintien des caractéristiques de l'endothélium.

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux communiquent et sont unies de manière presque parfaite par des complexes jonctionnels. Ils regroupent les jonctions gap (Simard et coll, 2003) qui permettent la communication entre les cellules endothéliales ainsi que les jonctions adhérentes (Schulze et Firth, 1993) et serrées (étanches) (Copin et Gasche, 2003) qui permettent de former l'imperméabilité à travers l'endothélium. Les jonctions adhérentes formant une zone de contact appelée zones d'adhérence, font intervenir la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadherin), protéine transmembranaire exprimée et interagissant entre chaque cellule endothéliale.

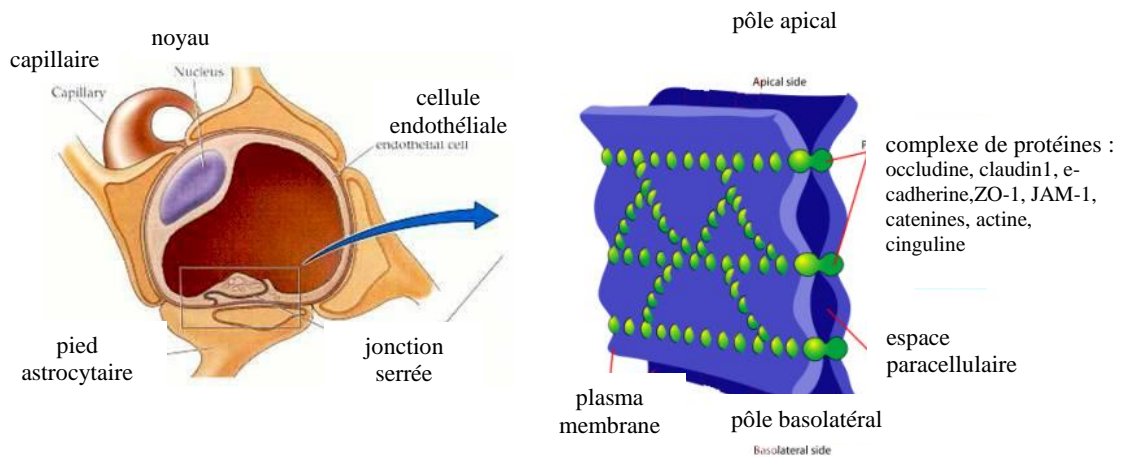


Figure 17: Les jonctions serrées des cellules endothéliales

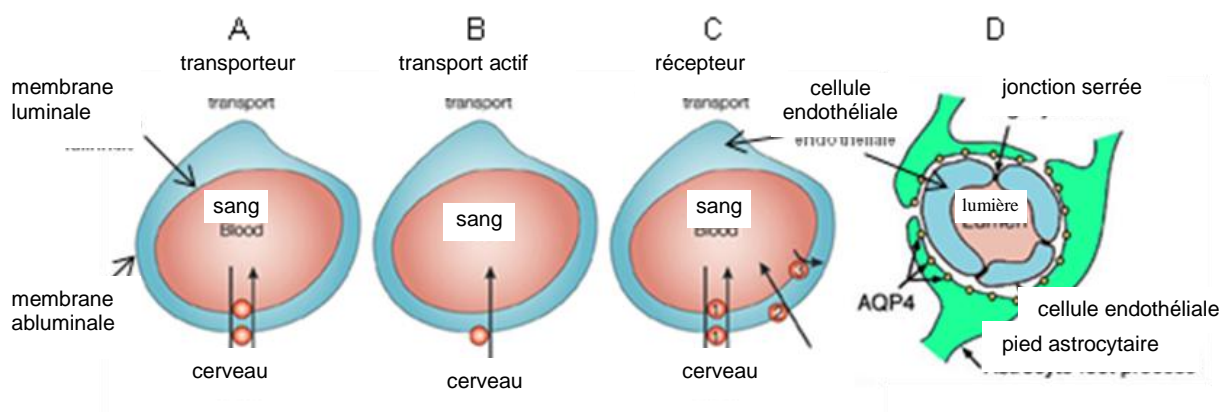
A proximité se trouve toujours une seconde zone de contact, les jonctions serrées appelées également zonulae occludens (**Figure 17**). Les membranes de deux cellules endothéliales adjacentes sont étroitement liées, conférant à l'endothélium des capillaires le contrôle de la perméabilité paracellulaire. (Copin *et coll*, 2003) Trois familles de protéines transmembranaires participent à l'élaboration de cette jonction : les claudines, les occludines et les molécules d'adhésion des jonctions (JAM). Des protéines cytoplasmiques telles que ZO-1, ZO-2, ZO-3 peuvent interagir d'une part avec les protéines transmembranaires et d'autre part avec l'actine du cytosquelette.

III.C.2 Echanges au niveau de la BHE

En condition normale, le franchissement de la barrière hémato-encéphalique n'est pas permis pour l'ensemble des composés circulant dans le système vasculaire cérébral. Ainsi, l'oxygène, le dioxyde de carbone, et les molécules lipophiles peuvent diffuser librement à travers la barrière. Cependant, des molécules essentielles comme le glucose représentant le substrat énergétique de choix pour les neurones et les acides aminés ne peuvent la passer. Le

cerveau a ainsi développé des systèmes de transport spécialisés pour assurer notamment son approvisionnement en éléments nutritifs.

Le passage des molécules au travers de la BHE peut s'effectuer, en plus par diffusion passive, par principalement 3 mécanismes de transports : la diffusion facilitée, le transport actif ou le mécanisme d'internalisation (endocytose). Le transport de glucose est facilité par la présence de transporteurs protéiques spécifiques : les GLUT (**Figure 18A**). Ainsi, GLUT-1 est largement exprimé sur les membranes lumineales et ablumineales des cellules endothéliales, alors que c'est la forme GLUT-3 qui est présente au niveau des membranes neuronales. Certains acides aminés et hormones sont aussi concernés par ce type de transport facilité. Le passage de protéines, telle que l'insuline, au sein du parenchyme cérébral se fait par endocytose (**Figure 18C**). Toutefois, dans des situations physiologiques, la très grande majorité des peptides et des protéines circulantes ne peuvent passer la BHE. Enfin, l'eau est conduite au travers de la BHE suivant les principes de l'osmolarité par des aquaporines, notamment exprimées au niveau de la membrane des pieds astrocytaires sous la forme AQP4 (**Figure 18D**).



(Pardridge, 2002)

Figure 18: Les différents types de transport à travers la barrière hémato-encéphalique

Dans l'autre sens, des transporteurs d'efflux membranaires (comme la glycoprotéine P) assurent l'expulsion de substrats du parenchyme cérébral vers le compartiment sanguin. Leur rôle est de refouler activement les molécules lipophiles qui passent au travers de la membrane des cellules endothéliales participant donc pleinement à l'effet barrière de l'endothélium des microcapillaires cérébraux (**Figure 18B**).

III.D. Le réseau veineux cérébral

En prélude à la formation des veines, les capillaires s'unissent pour former de très petites veines appelées veinules. Elles sont constituées d'une tunique interne faite d'un

endothélium et d'une tunique externe de tissu conjonctif. A mesure que les veinules s'approchent des veines, la tunique moyenne prend forme. En comparaison avec la structure des artères, les veines sont composées des mêmes couches dont les épaisseurs relatives varient. Les tuniques internes et moyennes sont beaucoup plus minces que celles des artères alors que la tunique externe est plus épaisse. En raison de ces différences, les veines sont suffisamment extensibles pour s'adapter aux variations de volume et de pression du sang circulant. Par opposition à l'écoulement artériel rapide et discontinu, le sang s'écoule lentement et de façon continue dans les veines d'où l'existence de valvules nécessaires dans ces systèmes à basse pression. Ces dernières empêchent le sang de refluer et, de cette manière, aide le sang à se diriger vers le cœur (**Figure 14, page23**).

Toutefois, les veines superficielles qui drainent le sang de la majeure partie du cortex ne présentent pas de valvules ni de tunique musculaire. Cette particularité anatomique permet leur dilatation et l'inversion du flux sanguin en cas d'occlusion d'un sinus. La variabilité anatomique des veines corticales, et le développement d'une circulation collatérale en cas de thrombose, rendent compte d'une part de l'absence de territoires veineux bien délimités au niveau cérébral, d'autre part de la possibilité de suppléance de ce réseau, contribuant à limiter la sévérité des lésions en cas d'ischémie.

III.E. Le drainage veineux

Le retour du sang veineux s'effectue par de nombreuses veines cérébrales qui forment au fur et à mesure du drainage, des systèmes veineux plus importants. Elles sont constituées d'un réseau superficiel et d'un réseau profond, ces deux réseaux s'abouchant dans des sinus contenus dans le dédoublement de la dure-mère formant une série de cavités communicantes.

Le drainage du cortex et de la substance blanche sous-jacente est assuré par les veines cérébrales superficielles constituées du groupe de veines cérébrales moyennes qui se desservent progressivement dans le sinus caverneux et du groupe des veines cérébrales inférieures qui drainent le sang des lobes frontaux dans le sinus longitudinal supérieur et le sang des lobes temporaux dans les sinus caverneux et transverses. Un autre système veineux, assuré par l'intermédiaire des veines cérébrales profondes, le drainage du sang en provenance des noyaux gris centraux, du diencéphale et de la substance blanche profonde des hémisphères et d'une partie du cortex temporal et occipital.

L'ensemble de ces différentes veines se regroupe plus en aval selon différents sinus. Le sinus sagittal supérieur reçoit notamment les veines superficielles corticales alors

que les veines cérébrales internes sont collectées par le sinus sagittal inférieur qui se termine dans le sinus droit. Les sinus latéraux (constitués en partie des sinus transverses) recueillent l'ensemble de ces grandes voies veineuses pour former finalement les veines jugulaires internes qui reçoivent l'essentiel du sang de l'encéphale. (**Figure 19**). Celles-ci descendent dans le cou où elles reçoivent le sang de quelques veines profondes du visage et du cou. Chaque veine jugulaire interne s'unit alors à la veine subclavière située du même côté formant une veine brachio-céphalique qui s'uniront pour constituer la veine cave supérieure.

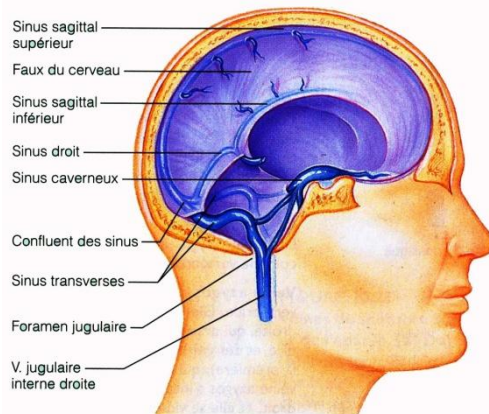


Figure 19: Représentation du drainage veineux cérébral

IV. Le muscle lisse vasculaire cérébral

IV.A. Généralités

Les apports au cerveau en substrats énergétiques sont amenés par le sang et dépendent donc du débit sanguin cérébral (DSC). Chez l'adulte, le DSC normal est en moyenne de 50 ml/min/100g de tissu cérébral. Il se définit par le rapport entre la pression de perfusion cérébrale (PPC) et la résistance vasculaire cérébrale (RVC). La PPC est la différence entre la pression artérielle à l'entrée et la pression veineuse cérébrale. Cette dernière étant négligeable dans les conditions physiologiques, la PPC peut être assimilée à la pression artérielle. La RVC résulte quant à elle de l'ensemble des forces qui s'opposent au passage du flux sanguin dans les vaisseaux (pression intracrânienne, viscosité du sang, état du lit vasculaire, tonus vasculaire) (Busija et Heistad, 1984). Dans les conditions physiologiques, la RVC dépend principalement du calibre des artérioles et des capillaires cérébraux.

Les myocytes vasculaires ont donc un rôle essentiel. Grâce en effet aux multiples caractéristiques du muscle lisse qu'ils forment et notamment à leur propriété spécifique de contraction et de relaxation, ils permettent en établissant les capacités vasoactives et le tonus vasculaire de réguler le débit sanguin cérébral des différentes artères cérébrales ainsi que de

leurs ramifications profondes constituant la microcirculation cérébrale, lieu d'échanges métaboliques entre le compartiment vasculaire et le tissu neuroglial.

IV.B. Les myocytes vasculaires forment un muscle unitaire syncytial

Les muscles lisses sont toujours organisés, à quelques exceptions près, en périphérie de l'organe qu'ils composent et entourent une cavité appelée lumière. C'est ainsi le cas pour la vessie, le tube digestif et aussi les vaisseaux sanguins. De part cette localisation particulière et de sa fonction première de pouvoir se contracter et se relâcher, le muscle lisse permet de contrôler l'écoulement des fluides de la lumière en faisant varier le diamètre de l'organe.

Au niveau vasculaire, les myocytes sont les cellules les plus représentées au niveau de la média de la paroi des artères cérébrales jusqu'au stade artériolaire et y constituent un muscle lisse viscéral. Leur forme est souvent allongée affichant un diamètre de l'ordre de 2 à 5 μm pour une longueur pouvant être variable. Elles sont généralement fusiformes et ne possèdent qu'un seul noyau. Les cellules sont organisées en feuillets, parallèles les unes aux autres et représentent de par leur activité synchrone une composante contractile capable de réguler le débit sanguin au sein de la microcirculation cérébrale.

L'ensemble des myocytes de la paroi vasculaire sont en effet liés entre eux par une matrice de tissu conjonctif, qui permet de transmettre au niveau du vaisseau perçu dans son ensemble, les forces générées de façon individuelle par chaque cellule. Cette matrice est un réseau constitué de protéines extracellulaires, de protéoglycanes et de glycoprotéines qui adhèrent à la surface cellulaire. A titre d'exemple, les fibres collagènes, principalement constituées de protéines fibreuses de collagène, sont les plus représentées au sein de la matrice. Les molécules de collagène sont sécrétées dans le liquide interstitiel et s'assemblent spontanément pour former des fibres entrelacées. Elles sont extrêmement robustes et apportent une grande résistance ainsi qu'une rigidité au tissu. Une deuxième composante importante est l'élastine. C'est une protéine fibreuse qui, en s'enroulant irrégulièrement sur elle-même sous forme de polymères de tropoélastines, forme les fibres élastiques. Elles peuvent lors d'une contrainte mécanique s'étirer puis reprendre leur forme de départ, conférant au tissu conjonctif souplesse et résistance aux chocs.

Le tissu conjonctif fait contact avec de nombreux points d'ancrages situés sur la membrane cellulaire du myocyte (le plasmalemma) comme les corps denses que nous décrirons par la suite, mais aussi avec les jonctions membranaires collant les myocytes entre eux, comme le sont les cellules endothéliales. On peut notamment noter la présence de

structures apparentées aux desmosomes réparties sur les côtés de chaque myocyte. Elles relient non seulement les cellules entre elles mais constituent également un réseau ininterrompu passant d'une cellule à une autre en interagissant avec le cytosquelette. Ils font intervenir des protéines de la classe des intégrines qui se lient d'une part à la matrice du tissu conjonctif et d'autre part au cytosquelette de chaque myocyte. La liaison des intégrines avec l'actine implique de nombreuses protéines associées au cytosquelette, comme l' α -actinine, la taline et la vinculine. Cette disposition a pour effet de répartir les tensions à travers l'ensemble de la couche de cellules et empêche celle-ci de se déchirer lorsqu'elle est étirée, participant là aussi aux propriétés de mécanotransduction du muscle lisse vasculaire.

Les gaps junctions (aussi appelés nexus) sont aussi exprimées à la surface de chaque myocyte. En plus d'apporter un lien mécanique entre chaque cellule, elles réalisent surtout une véritable communication électrique et métabolique entre les myocytes. Ce sont des complexes résultant de l'association de 6 sous unités (connexines ou Cx) qui forment un canal ("hemi-gap junction") au niveau du plasmalemme. Deux canaux appartenant à 2 myocytes distincts s'associent pour former un canal final (connexon) et permettent la communication intercellulaire. Plus de 20 connexines ont été identifiées à ce jour, et seules quelques sous types sont localisés au niveau des myocytes : les Cx37, Cx40, Cx43 et Cx45. Elles s'organisent en nombre sous forme de plaques jonctionnelles qui autorisent le passage d'un courant électrique (sous forme d'ions) tels que les potentiels d'action et le passage de molécules intracellulaires (métabolites). Le couplage assuré par ces jonctions peut être modulé par la variation du nombre de connexons exprimés, par leur conductance unitaire ou par leur probabilité d'ouverture. L'ensemble de ces facteurs peuvent être sous la dépendance de régulations cellulaires complexes.

Ces caractéristiques impliquant les propriétés de mécanotransduction du tissu conjonctif ainsi que celle de communication via des gap junctions permettent aux centaines voire aux millions de fibres musculaires de la paroi vasculaire d'être interconnectées et de former un muscle lisse syncytial. Les myocytes agissent alors de façon synchrone comme une seule sous unité (muscle lisse unitaire). Les multiples points d'adhérences des membranes cellulaires permettant la transmission en parallèle des forces de contraction déclenchées d'une cellule à la suivante.

IV.C. L'appareil contractile du muscle lisse des artères cérébrales

Le muscle lisse vasculaire n'a pas la même disposition en stries verticales des filaments d'actine et de myosine observée dans le muscle squelettique. Un grand nombre de

filaments d'actine sont attachés à des structures appelées corps denses disposés de façon hélicoïdale en suivant l'axe longitudinal de la cellule (**Figure 20**). A l'intérieur de la cellule, les corps denses sont maintenus en place par un échafaudage d'éléments structurels protéiques les reliant entre eux. Certains de ces corps sont attachés au plasmalemme et s'organisent en bandes denses pouvant interagir avec celles des cellules voisines. Ces liaisons participent là aussi à la mécanotransduction des forces transmises d'une cellule à l'autre. Des filaments intermédiaires non contractiles sont fixés aux corps denses et participent à la constitution d'un cytosquelette résistant qui dirige la traction exercée par le glissement des myofilaments lors de la contraction.

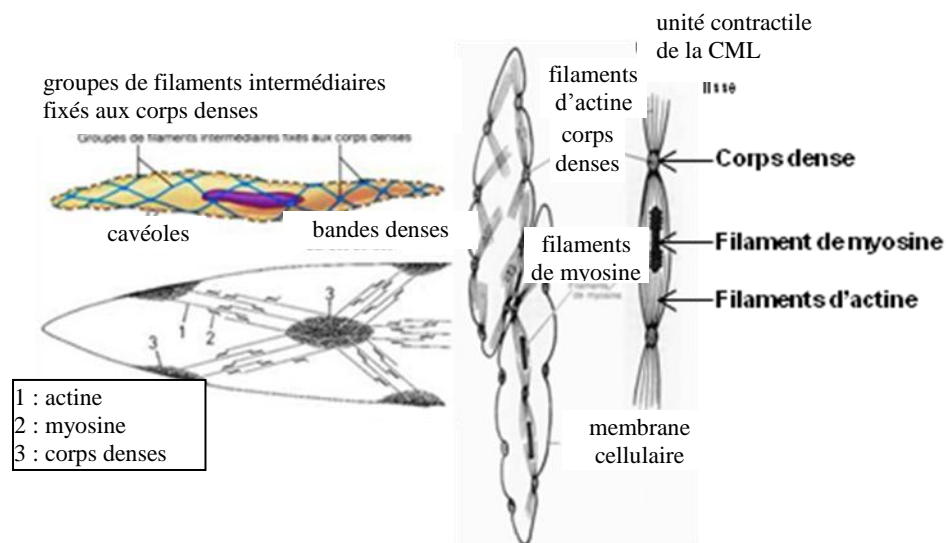


Figure 20: Les composants cellulaires de la contraction du muscle lisse

Dans la fibre musculaire, un petit nombre de filaments de myosine sont mêlés à de nombreux filaments d'actine qui sont organisés en unités contractiles individualisées. A ce niveau, les filaments d'actine s'organisent à partir de 2 corps denses et recouvrent un unique filament de myosine qui sera le lieu de glissement des myofilaments entre eux. A la différence du muscle strié, les filaments de myosine sont situés à mi-distance entre chaque corps dense et portent de nombreuses têtes sur toute leur longueur.

La formation des ponts acto-myosine et donc le développement de la force (contraction) nécessite la phosphorylation préalable des chaînes légères des têtes de la myosine (myosine LC₂₀) par une enzyme spécifique : la kinase de la myosine LC₂₀ (MLCK). Cette kinase est activée par un complexe 4Ca²⁺-calmoduline (4Ca²⁺-CaM) formé lors de l'élévation de la concentration de Ca²⁺ libre cytosolique provenant des tubules du réticulum sarcoplasmique mais aussi de l'espace extracellulaire. La phosphorylation des chaînes légères de myosine permet alors l'interaction entre les têtes de la myosine avec les filaments d'actine (**Figure 21A**) (Akata, 2007). Le changement conformationnel s'effectue lors de l'hydrolyse

de l'ATP de la tête de myosine alors que celle-ci interagit avec l'actine et va provoquer un glissement de 10 nm entre les filaments d'actine et de myosine résultant en la création d'une force (d'environ 3 à 7 picoNewtons).

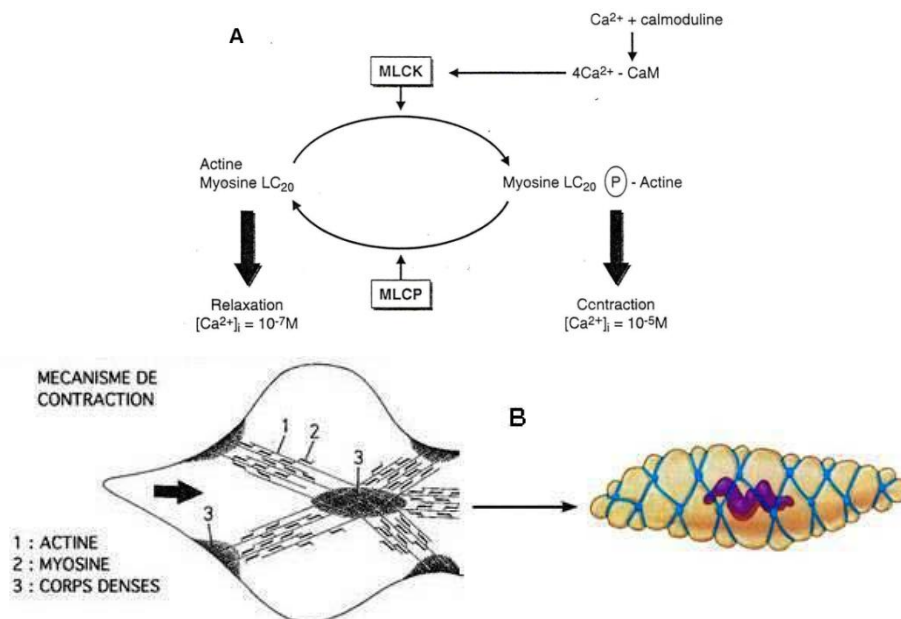


Figure 21: Contraction de la cellule musculaire lisse

Comme les protéines contractiles sont disposées dans un réseau inséré de façon circumférentielle dans la cellule, la contraction produit un raccourcissement du myocyte qui prend une forme globulaire, contrastant avec sa forme caractéristique allongée au repos. La tension produite par la contraction est ainsi transmise par l'intermédiaire des bandes et corps denses à l'ensemble des cellules musculaires lisses et produit une vasoconstriction de l'artère cérébrale considérée (**Figure 21B**).

Une fois la contraction effectuée, l'extrusion et le repompage du Ca^{2+} inactivent la kinase MLCK et démasque l'activité de la phosphatase de la myosine LC_{20} (MLCP). Celle-ci déphosphoryle la myosine LC_{20} provoquant la dissociation des ponts acto-myosine et la relaxation. De ce fait, la relaxation est un mécanisme purement passif dans le sens où il n'y a pas intervention de systèmes protéiques assurant le mécanisme inverse provoquant la relaxation. Celle-ci est transmise au niveau de l'ensemble du vaisseau par les multiples points de contacts existants entre les myocytes qui transmettent les forces tendant à les faire revenir à leur longueur d'origine.

IV.D. Couplage excitation-contraction du muscle lisse vasculaire

Les muscles lisses ont pour la plupart des contractions toniques prolongées pouvant tenir pendant quelques heures voire des jours. La fraction de temps où les ponts

transversaux de myosine restent accrochés aux filaments d'actine, qui constitue l'étape déterminant la force de contraction est élevée. Ce cycle lent est dû à une faible activité d'hydrolyse de l'ATP (une seule molécule pour chaque cycle) comparée à celle des muscles squelettiques, permettant que moins d'énergie ne soit utilisée pour entretenir la contraction du muscle lisse. Il possède en outre une grande capacité à se raccourcir, tout en maintenant sa pleine force de contraction, rendant possible pour le vaisseau sanguin de pouvoir modifier le diamètre de leur lumière dans de larges limites.

Une caractéristique particulière du muscle lisse est son mécanisme "de verrouillage". Une fois qu'il a développé sa pleine contraction, l'activation du muscle lisse peut être réduite à un degré beaucoup plus bas que le niveau initial permettant au muscle de maintenir sa pleine force de contraction avec une consommation énergétique minimale.

Le tonus vasculaire déterminé par l'état de contraction des myocytes, contrôle la pression artérielle et la répartition des débits. Les deux principaux facteurs conditionnant le degré de contraction et de relaxation du muscle lisse sont la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique et la sensibilité de l'appareil contractile au Ca^{2+} . Le myocyte doit donc être capable d'augmenter la concentration de Ca^{2+} rapidement, et de la diminuer tout aussi rapidement. La membrane plasmique des fibres musculaires lisses possèdent de petites invaginations appelées cavéoles dans les régions où ne sont pas retrouvées les bandes denses. Leur structure est maintenue par un réseau de sous unités de cavéolines ainsi que de cholestérol. Les cavéoles, en retenant une concentration élevée de Ca^{2+} près de la membrane, permettent de provoquer un afflux rapide de Ca^{2+} lorsqu'il y a activation puis ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. De plus, dans ces espaces caveolaires sont retrouvés à proximité les uns des autres de nombreux agents intervenant dans la signalisation cellulaire (récepteurs, canaux ioniques, transporteurs, protéines G...) leur permettant d'interagir entre eux. Ces cavéoles apparaissent donc comme des structures particulières dévolues à l'intégration et à la transduction de nombreux signaux extracellulaires vers l'intérieur du myocyte.

Le muscle lisse possède un réticulum sarcoplasmique généralement peu développé. Des tubules sarcoplasmiques distincts sont en effet retrouvés à la périphérie de la cellule près de la membrane cellulaire. Leur rôle majeur est de pouvoir libérer de façon contrôlée dans le cytosol par des systèmes de transports spécifiques le calcium stocké à l'intérieur (par des protéines liant le Ca^{2+} : calséquestrine, sarcoluménine, calréticuline...) et de pouvoir le recapter par la suite.

Cette disposition du réticulum à proximité du plasmalemma permet de séparer le cytosol du myocyte en différents espaces où la concentration en calcium cytosolique peut être régulée de façon indépendante. L'un est situé sous le plasmalemma et permet de faire interagir le calcium avec les canaux ioniques et les enzymes membranaires intervenant dans l'initiation et le déclenchement de la contraction tandis que l'autre, plus profond, correspond à l'espace de l'appareil contractile, effecteur final de la contraction.

A l'état basal, la concentration du compartiment extracellulaire avoisine 1 à 2 mM et 10 à 15 mM pour le réticulum sarcoplasmique. La concentration cytoplasmique en Ca^{2+} , qui est d'environ 0,1 μM , résulte d'un équilibre, entre d'une part, les sorties de Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire (via les Ca^{2+} -ATPases membranaires et dans une moindre mesure l'échangeur Na^+ - Ca^{2+}) ou vers le réticulum sarcoplasmique par des ATPases Ca^{2+} -dépendantes : les SERCAs (Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase), et les entrées de Ca^{2+} à partir du milieu extracellulaire (canaux calciques voltage-dépendants de type L majoritairement) ou des compartiments intracellulaires (récepteur-canal activé par l'inositol 1,4,5 triphosphate : InsP_3 , et canal Ryanodine (RyR) activé par le Ca^{2+}). Quand la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique est inférieure à 1 μM , le myocyte est dans état plutôt relâché. Par contre, la base moléculaire de sa contraction est sous l'étroite dépendance de l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, pouvant provenir de plusieurs origines (Akata, 2007).

IV.D.1 Mécanisme de l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire

Le Ca^{2+} d'origine extracellulaire et sarcoplasmique peut être utilisé par le myocyte pour augmenter la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} et ainsi provoquer sa contraction. Cette augmentation peut être due à une modification du potentiel de membrane (couplage électromécanique) qui va provoquer l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants et permettre l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire. La hausse de Ca^{2+} peut également résulter de la liaison d'un agoniste à un récepteur spécifique (couplage pharmacomécanique), augmentant le taux de Ca^{2+} par la libération du calcium des réservoirs intracellulaires. Ces 2 systèmes sont dépendants et agissent en synergie.

IV.D.1.a Le couplage pharmacomécanique

Dans ce cas, la hausse de Ca^{2+} intracellulaire n'est pas due à une dépolarisation de la membrane, même si une modification du potentiel de membrane peut apparaître secondairement. Différents mécanismes ont été proposés, en particulier celle impliquant l'activation de la cascade des phosphatidyls-inositols qui provoque l'augmentation de l' IP_3 .

La majorité des vasoconstricteurs provoquent une contraction des myocytes via leur liaison à un récepteur couplé à la phospholipase C. Elle va former, suite à son activation, de l'IP₃ et du Diacylglycérol (DAG) à partir du PIP₂ de la bicouche phospholipidique de la membrane. L'IP₃ va ensuite se fixer sur les canaux calciques récepteurs à l'IP₃, ce qui va provoquer leur ouverture et libérer le calcium selon son gradient de concentration. Ensuite, un mécanisme de libération de calcium induit par le calcium appelé "calcium induced calcium release" (CICR) se met en place et provoque une sortie massive de calcium des réservoirs intracellulaires. Les canaux RYR sensibles au calcium sont activés par le calcium libéré via les récepteurs canaux sensibles à l'IP₃ et vont déclencher une rapide sortie du calcium du réticulum. Le calcium libéré se complexera avec la calmoduline permettant l'interaction avec l'appareil contractile.

IV.D.1.b Le couplage électromécanique

Le potentiel de membrane des myocytes des artères de résistance est situé entre -65 mV et -70 mV. Les canaux potassiques que nous étudierons par la suite, et des canaux chlores dépendants du calcium interviennent dans le maintien et la modulation du potentiel de membrane.

La modification du potentiel de membrane de ± 3 mV augmente (dépolérisation) ou diminue (hyperpolarisation) de deux fois l'entrée de Ca²⁺. La principale voie d'entrée du calcium extracellulaire est représentée par les canaux calciques dépendants du potentiel de type L. Dans les artères de résistance, cette entrée de calcium est majorée par la libération de calcium des stocks calciques intracellulaires via là aussi le mécanisme de CICR (Gregoire et coll, 1993).

Ces canaux sont constituées de 5 sous unités : α_1 , α_2 , β , γ , δ (Gollasch et Nelson, 1997). La sous unité α_1 possède des sites de régulation par différents modulateurs, des sites de phosphorylation, un segment sensible au potentiel, le site de sélectivité au Ca²⁺, et les domaines d'activation et d'inactivation du canal. Le type L (« long lasting ») indique, par rapport à ceux de type T ("transient"), qu'ils sont activés par une forte dépolérisation, à partir de -40 mV, leur activation étant complète à 0 mV, mais qu'ils sont inactivés moins rapidement que les canaux de type T (300 à 600 ms) (McDonald et coll, 1994).

Récemment, un autre mécanisme faisant intervenir les canaux Ca²⁺ voltage-dépendants de type L agissant comme détecteur de la dépolérisation membranaire a été proposé (Urena et coll, 2007). Suite à cette détection, il activerait via la protéine G avec laquelle il serait couplé, la cascade de la phospholipase C. Il s'ensuivrait ensuite le mécanisme

de CICR du couplage pharmacomécanique, conduisant à une vasoconstriction même en cas d'absence d'influx calcique provenant du compartiment extracellulaire (**Figure 22**). Ce couplage du canal calcique de type L à la protéine G lui donne ainsi une nouvelle action d'ordre métabotrope, amenant à une libération du calcium induit par les canaux calciques (CCICR : calcium channel-induced Ca^{2+} release).

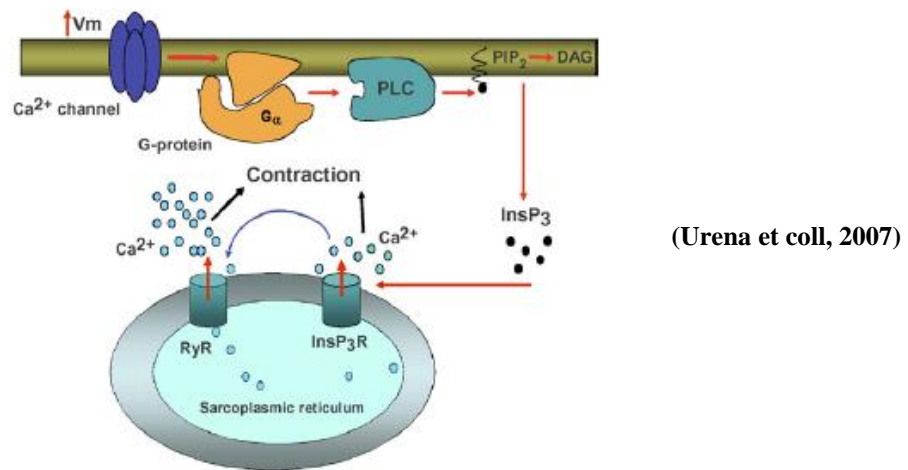


Figure 22: Mécanisme de libération de calcium induite par des canaux calciques (CCICR)

IV.D.2 Sensibilisation-désensibilisation de l'appareil contractile

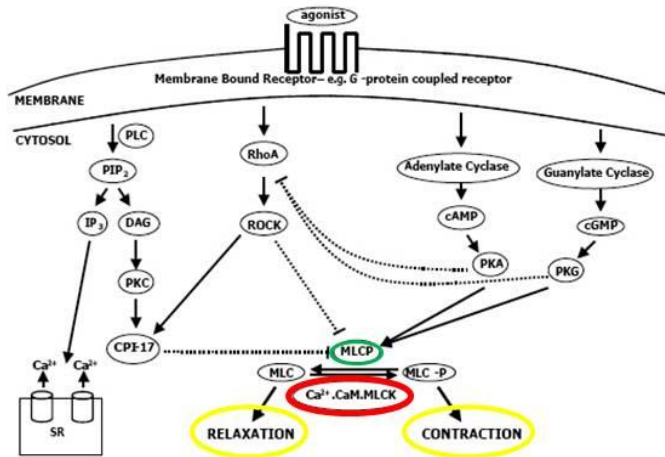
Bien que l'augmentation de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} soit le principal déterminant de la contraction du muscle lisse vasculaire, il n'existe pas toujours de parfaites corrélations entre cette valeur et la force développée par le muscle lisse. Effectivement, de nombreux agonistes tels que la noradrénaline, l'endothéline 1 et l'histamine produisent un niveau de phosphorylation de la myosine et une force contractile supérieurs à ceux produits en l'absence d'agoniste, et ce à des concentrations de Ca^{2+} cytoplasmique constante (Kuriyama et coll, 1995). Cette augmentation de force induite par les agonistes constitue le phénomène de sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile, particulièrement développé dans le muscle vasculaire où il constitue une voie importante de régulation de la vasoréactivité (**Figure 23**) (Akata, 2007).

Deux mécanismes sont impliqués dans la sensibilisation de l'appareil contractile. Le premier concerne la modulation de l'activité de la MLCP par des voies de régulation intracellulaire et l'autre concerne la phosphorylation de protéines régulatrices associées aux filaments fins d'actine. La MLCP est notamment composée de plusieurs sous unités dont une régule globalement son activité : la MYPT. La modulation de celle-ci induit une diminution d'activité de la MLCP conduisant à une hausse du niveau de phosphorylation de la myosine LC_{20} et donc à une augmentation de la force de contraction, à une concentration en calcium

intracellulaire donnée (Somlyo et Somlyo, 2003). La MLCP apparaît être le facteur majeur qui entre en jeu dans la modulation de la force contractile du muscle lisse par des agonistes vasoactifs.

Plusieurs messagers intracellulaires peuvent modifier l'activité de la MLCP dont le DAG ou l'acide arachidonique (AA). Divers agonistes sensibilisants tels que la sérotonine ou la phényléphrine (agoniste $\alpha 1$ -adrénergique) stimulent la production d'acide arachidonique via l'activation de la phospholipase A_2 . Ils activent la protéine kinase C qui inhibe indirectement la MLCP par la phosphorylation de la protéine CPI-117, protéine spécifique du muscle lisse. Celle-ci inhiberait alors la MLCP non pas par phosphorylation mais plutôt par un mécanisme d'inhibition des différentes sous unités de la MLCP (Eto et coll, 1995). L'effet sensibilisant des agonistes vasoconstricteurs implique des protéines G, dont notamment RhoA, une petite protéine G homologue à celle de la famille Ras. Elle activerait suite à sa stimulation une protéine : la ROCK : kinase associée à RhoA, qui phosphoryle la MYPT, inhibant l'activité de la MLCP (Muranyi et coll, 2005). Elle peut aussi activer la protéine CPI-117 menant là aussi à une inhibition de la MLCP.

Il existe d'autres mécanismes qui permettent, à l'opposé, d'empêcher l'inhibition de la MLCP (Lubomirov et coll, 2006). Ils mènent à une diminution du niveau de phosphorylation de la myosine LC20 et donc à une diminution de la force de contraction, à concentration de calcium cytosolique donnée (**Figure 23**). Les Protéines kinases AMPc-dépendantes (PKA) et GMPc-dépendantes (PKG) peuvent ainsi, en phosphorylant la MLCP, empêcher l'action inhibitrice de protéines comme la ROCK. De plus, les PKA et PKG peuvent, en amont de l'activation de ROCK, soit respectivement diminuer l'activité de la protéine G responsable de l'activation de RhoA, soit diminuer l'activité de ROCK par l'inhibition de RhoA (Gudi et coll, 2002; Manganello et coll, 2003).



Flèches pleines : activation

Flèches en pointillées : inhibition

Abbreviations: CPE-17 - PKC potentiated inhibitor protein of 17kDa; DAG - diacylglycerol; IP3 - inositol 1,4,5 trisphosphate; MLC - regulatory light chains of myosin; MLCK - myosin light chain kinase; MLCP - myosin light chain phosphatase; MLC-P - phosphorylated regulatory light chains of myosin; PIP2 - phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PKA - protein kinase A; PKC - protein kinase C; PKG - protein kinase G; PLC - phospholipase C; RhoA - membrane of Ras homology family of small GTPases; ROCK - RhoA associated kinase; SR - sarcoplasmic reticulum.

(Janssen et coll, 2007)

Figure 23: Voies de signalisation impliquées dans la réponse contractile du muscle lisse

La phosphorylation de protéines régulatrices associées aux filaments fins d'actine telle que la caldesmone et la calponine participe à la variation de sensibilité au Ca^{2+} , et donc à la contractilité du muscle lisse. La caldesmone peut, entre autre, diminuer l'activité d'hydrolyse de l'ATP de la myosine en interagissant simultanément avec l'actine et la myosine. Cet effet peut alors être modulé par des phosphorylations via différentes kinases (CaMK II, ERK 1/2...) provoquant le mécanisme de sensibilisation (Morgan et Gangopadhyay, 2001). Il en est de même pour la calponine même si le mode d'action de celle-ci reste encore confus.

V. Régulation du potentiel de membrane par les canaux potassiques de la cellule musculaire lisse

V.A. Rôles physiologiques des canaux ioniques au sein du muscle lisse vasculaire cérébral

Les cellules qui composent la paroi vasculaire des vaisseaux de résistance et de la microcirculation cérébrale (cellules musculaires lisses, péricytes et cellules endothéliales) expriment une très grande variété de canaux ioniques. Les myocytes vasculaires cérébraux expriment au moins 4 types de canaux potassiques, mais ils expriment aussi des canaux calciques voltage dépendants, le type L étant le plus représenté. Des canaux chlores sont aussi exprimés ainsi que des canaux non sélectifs aux cations faisant partie de la famille des TRP (Transient Receptor Potential family). Il apparaît de plus en plus qu'il existe une spécificité d'expression de ces canaux en fonction du territoire concerné (stade artériel ou artériolaire

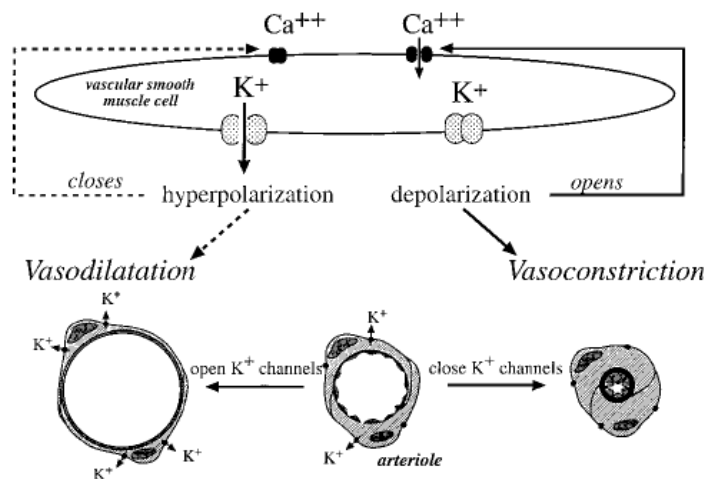
voire capillaire pour les cellules endothéliales) qui est en étroite relation avec le fonctionnement du système vasculaire intégré dans le tissu neuroglial (exemple de l'expression des canaux Kir au stade artériolaire).

La modulation du potentiel de membrane par des acteurs cellulaires comme les canaux potassiques est un élément important de la régulation du tonus vasculaire. Elle peut en effet participer avec d'autres mécanismes, dont notamment la sensibilisation de l'appareil contractile ou la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique, en agissant sur le diamètre de l'artère.

V.B. Rôles physiologiques des canaux potassiques au sein du muscle lisse vasculaire cérébral

Les myocytes des artérioles de la microcirculation jouent un rôle central dans la régulation du débit sanguin cérébral, de sa bonne régulation entre les différents territoires artériels et dans les échanges entre le sang et le tissu neuroglial au niveau des capillaires. En contribuant largement à la mise en place et à la régulation du potentiel de membrane et donc du tonus vasculaire des artères cérébrales, les canaux potassiques ont un rôle pivot dans la réalisation de l'ensemble de ces fonctions.

Les canaux potassiques sont les canaux ioniques les plus exprimés au niveau de la membrane plasmique des myocytes artériolaires. Leur activation, en vertu du gradient électrochimique, provoque la sortie d'ions K^+ et fait tendre le potentiel membranaire vers une hyperpolarisation. Au contraire, leur fermeture provoque une dépolarisation provoquant "l'activité de fond" des canaux potassiques au repos. Cette dépolarisation déclenche l'ouverture des canaux Ca^{2+} et donc tout le mécanisme dépendant du calcium intracellulaire menant au final à la vasoconstriction (**Figure 24**). Les myocytes vasculaires cérébraux expriment au moins 4 grands types de canaux potassiques : les canaux potassiques calcium dépendants, voltages dépendants, rectifiants entrants et dépendants de l'ATP intracellulaire.



(Jackson, 1998)

Figure 24: Régulation du tonus vasculaire par les canaux potassiques des myocytes

V.B.1 Les canaux potassiques rectifiants entrants (Kir2.x)

Les canaux Kir sont restés longtemps les plus méconnus des canaux potassiques de la cellule musculaire lisse vasculaire. Ils résultent de l'assemblage en tétramère des sous unités α . Chaque sous unité est formée de 2 segments transmembranaires M1 et M2 reliés l'un à l'autre par une boucle hydrophile H5 (ou aussi appelée domaine P), responsable de la sélectivité aux ions K^+ , qui se replie dans la membrane (Figure 25). Au niveau des artères cérébrales, et en particulier de l'artère cérébrale moyenne, seules les isoformes Kir2.1 et Kir2.2 sont exprimées, d'où la dénomination de Kir2.x, qui permet le regroupement simultané de l'activité de ces deux isoformes.

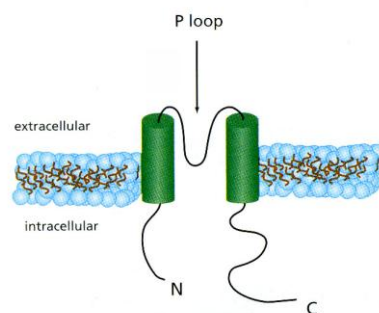


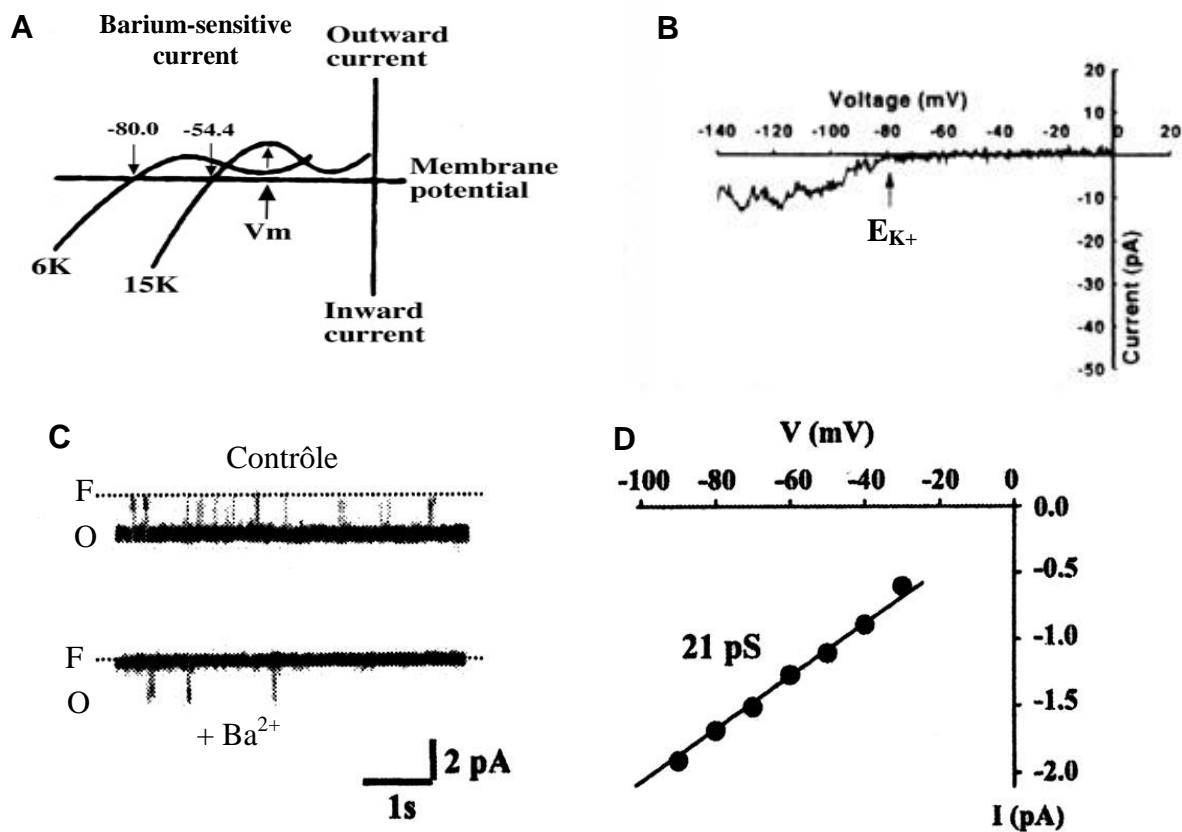
Figure 25: Structure des canaux Kir

Les courants Kir présentent une propriété de rectification entrante (Figure 26) liée au blocage voltage-dépendant de canaux, au niveau de la région cytoplasmique du pore, par des ions Mg^{2+} et par des formes ioniques de différentes polyamines issues du catabolisme de l'ornithine (spermine, spermidine, putrescine, cadavérine). Ce blocage est plus effectif pour les potentiels dépolarisés. Cette caractéristique électrophysiologique permet de générer des courants potassiques entrants plus grands à des potentiels de membrane plus négatifs que le

potentiel d'équilibre de l'ion K^+ , et à des courants potassiques sortants d'autant plus faibles que la dépolarisation membranaire est plus forte (Quayle *et coll*, 1993).

L'importance de la rectification (forte ou faible) dépend du degré d'affinité d'une région du pore pour les ions Mg^{2+} ou pour les différentes polyamines. La propriété rectifiante entrante forte des Kir2.x est liée à la présence de 2 acides aminés chargés négativement à la sortie du segment M2 de la membrane et à l'extrémité carboxy-terminale qui permettent une interaction de haute affinité avec les ions Mg^{2+} et les polyamines.

Dans la gamme de potentiels physiologiques de la cellule musculaire lisse (-60 à -30 mV), les canaux Kir2.x laissent donc passer un petit courant sortant (à peine quelque pA) avec une conductance élémentaire se trouvant toujours aux valeurs de 20 pS (**Figure 26C et D**). Par leur activité, les canaux Kir participent à la mise en place du potentiel de repos du myocyte et au maintien dans un état d'hyperpolarisation participant au contrôle du diamètre basal des petites artères. Toutefois, à la différence des canaux Kv et KCa, ils n'interviennent pour les potentiels dépolarisés, en raison du faible courant sortant s'activant à ces potentiels.



(Nelson et Quayle, 1995; Park *et coll*, 2008)

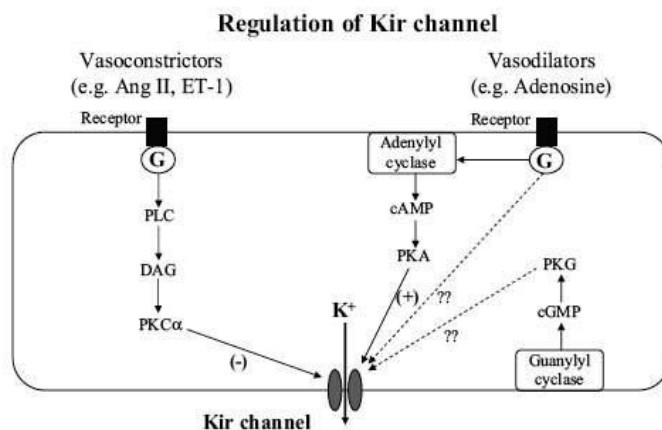
Figure 26: Propriétés électrophysiologiques des canaux Kir2.x

A : Activation des canaux Kir2.x par l'augmentation de la concentration en potassium extracellulaire. **B** : Relation courant-potential montrant l'inversion du courant au potentiel d'équilibre pour l'ion K⁺. **C** : Enregistrement du courant en configuration canal unitaire mesuré à -140 mV en condition contrôle et avec baryum (F : canal à l'état fermé, O : canal à l'état ouvert). **D** : Relation courant unitaire moyenné-potential, estimant la conductance du canal à 21 pS.

Les canaux Kir sont bloqués par le baryum à des concentrations micromolaires et sont activés par une augmentation de la concentration en potassium extracellulaire (**Figure 26A et B**) (Quayle *et coll*, 1993). Dans la microcirculation cérébrale, cette activation suite à une libération de K⁺ à proximité des canaux mène à une hyperpolarisation du myocyte et à une vasodilatation sensible au baryum qui lui est associée lorsque la concentration s'élève de

5 mM à 8-15 mM. De façon générale, les petites artères de résistance expriment une densité de courant Kir plus importante que les artères élastiques, expliquant le fait que ces dernières ont une moindre vasoréactivité vis-à-vis d'une augmentation en potassium extracellulaire par rapport aux artères de résistance (Quayle et coll, 1996).

Au niveau des petites artères, le Kir des myocytes est sous l'influence de facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs (**Figure 27**). Bien que cela n'ait pas encore été prouvé au niveau cérébral, l'endothéline-1 pourrait inhiber l'activité des canaux Kir par la voie de signalisation impliquant la phospholipase C. L'adénosine, puissant vasodilatateur impliqué dans le contrôle du DSC vis-à-vis des demandes métaboliques, pourrait activer les canaux Kir via la voie des protéines Kinases A. L'endothélium pourrait aussi avoir une influence vasodilatatrice par l'activation des canaux Kir par le NO, impliquant dans ce cas la voie de la guanylate cyclase (Schubert et coll, 2004), et par les ions K^+ qui seraient libérés suite à l'activation des canaux KCa endothéliaux (Edwards et Weston, 2004).



(Park et coll, 2008)

Figure 27: Voies potentielles de régulation des canaux Kir2.x du muscle lisse vasculaire

V.B.2 Les canaux potassiques voltage dépendants (K_v)

Ils s'organisent en homotétramères ou hétérotétramères de sous unités α qui forment le pore du canal et chacune peut être associée avec des sous unités auxiliaires qui sont intracellulaires. Celles-ci s'avèrent être importantes fonctionnellement en modulant l'activité du tétramère de base formé par les seules sous unités α .

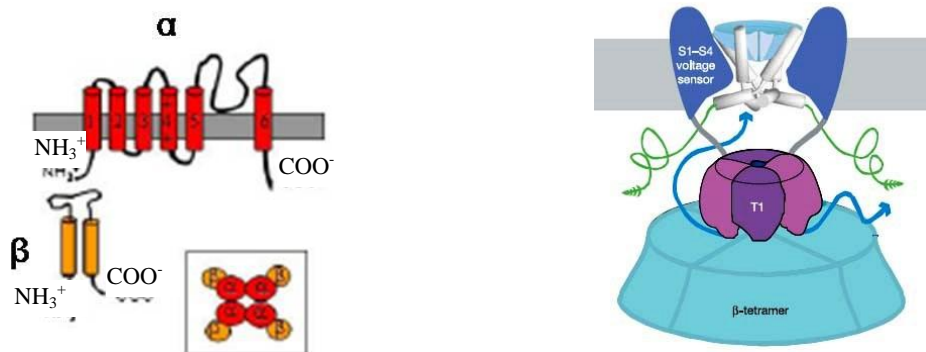


Figure 28: Structure générale des canaux Kv

Les sous unités α sont formées de 6 segments transmembranaires S1 à S6. Le segment S4 possède une séquence riche en lysine et arginine chargée positivement constituant le voltage sensor du canal ionique. Entre les segments S5 et S6 se retrouve la région H5 qui confère la sélectivité aux ions K^+ (**Figure 28**). Les extrémités aminoterminales s'organisent entre elles pour former un domaine T1 tétramérique qui permet l'interaction avec les sous unités auxiliaires ou avec d'autres protéines.

Les sous unités auxiliaires peuvent moduler l'activité du canal en faisant varier des paramètres de différentes natures, par exemple, la conductance unitaire, la voltage dépendance, les propriétés d'activation, d'inactivation et de déactivation mais aussi les mécanismes qui contrôlent l'adressage des canaux ioniques à la membrane. Il en existe une multitude à travers les différents types cellulaires ($Kv\beta$, KChIP, KChAP, minK...), chacune apportant une propriété électrophysiologique particulière. De plus, l'extrémité carboxy-terminale peut interagir avec des régulateurs intracellulaires (guanylates kinases : PSD 95, SAP 97) régulant leur répartition en domaine sur la membrane ou aussi leur internalisation.

De façon générale il existe une grande disparité entre l'expression des transcrits et la présence effective de la protéine canal fonctionnelle suggérant une régulation complexe de l'expression de ces canaux au niveau de la membrane cellulaire. Les artères cérébrales expriment au moins 6 transcrits d'isoformes de sous unités $Kv\alpha 1$ mais les canaux fonctionnels ne semblent finalement comporter que des sous unités $Kv\alpha 1.2$ et $Kv\alpha 1.5$ qui s'assemblent généralement en hétérotétramères. L'isoforme $Kv\alpha 2.1$ est aussi exprimée au niveau des artères cérébrales et semble pouvoir former des canaux fonctionnels, au même titre que ceux de la famille $Kv1$ (Amberg et Santana, 2006). La sous unité $Kv\beta 2$ qui interagit avec l'extrémité amino-terminale de chaque sous unité α , semble être exprimée au niveau des artères cérébrales et serait responsable de l'inactivation lente observée au niveau des courants.

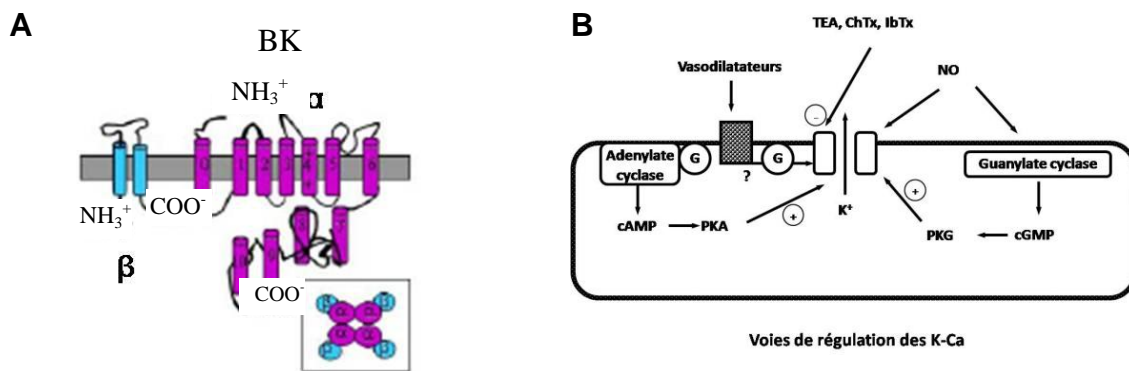
Ils sont activés par une dépolarisation de la membrane et leur activité permet de limiter cette dépolarisation. Ils contribuent, au même titre que les canaux KCa, au retour vers le potentiel de repos par une hyperpolarisation suite à la vasoconstriction (Plane *et coll*, 2005). La très grande majorité des canaux Kv affiche une propriété de rectification sortante et dans le cas des artères cérébrales, ils présentent une inactivation lente. Ils sont sélectivement bloqués par la 4-aminopyridine, le corréolide et l'agitotoxine-2.

Au niveau artériolaire, ils peuvent être activés suite à des effets vasodilatateurs de l'adénosine, de la PGI₂ et du cGRP via la voie de la protéine kinase A. Les vasoconstricteurs tendent à diminuer les canaux Kv par l'activation de la voie de la protéine kinase C. La voie de la Rho-kinase pourrait elle aussi agir en induisant leur fermeture par phosphorylation (Luykenaar *et coll*, 2004).

V.B.3 Les canaux potassiques calcium-dépendants (K_{Ca2+})

Fonctionnellement parlant, les canaux KCa²⁺ sont classés en 3 groupes hétérogènes selon que leur conductance unitaire est faible, intermédiaire ou grande. Les canaux BKCa (Big conductance) sont les plus exprimés au sein des tissus vasculaires. Leur conductance unitaire est située dans l'intervalle 200-300 pS.

Ils sont formés en tétramères de sous unité α qui montrent des similitudes avec la sous unité α des canaux Kv (**Figure 29A**). Chacune possède les 6 segments transmembranaires (S1 à S6) déjà évoqués avec un segment S0 supplémentaire à l'extrémité amino-terminale. Celui-ci interagit avec une sous unité auxiliaire β formée de 2 segments transmembranaires et d'une boucle extracellulaire. Le segment S4 reste le voltage sensor du canal ionique. La séquence de la sous unité α se poursuit par 4 autres domaines hydrophobes (S7 à S10) qui possèdent 2 sites de régulation du canal vis-à-vis du calcium intracellulaire. Avec les sous unités β , ces 2 sites régulateurs lui confèrent sa sensibilité au Ca²⁺ (Ko *et coll*, 2008). La partie carboxy-terminale est aussi la cible d'éléments régulateurs comme les protéines kinases et les phosphatases.



(Nelson *et coll*, 1995)

Figure 29: Structure générale des canaux KCa et leurs voies de régulation

Les canaux KCa possèdent des propriétés voltage-dépendantes lorsqu'il y a interaction avec le Ca²⁺ intracellulaire dans une large gamme de concentration. Ils jouent un rôle majeur dans la vasodilatation en agissant comme un système tampon pour limiter la contraction. Effectivement, lorsqu'une élévation de la pression artérielle se produit, la membrane se dépolarise, activant les canaux Ca²⁺ voltage-dépendants. L'influx calcique induit la libération de Ca²⁺ sous forme de sparks des stocks intracellulaires du réticulum sarcoplasmique. Ils activent alors les canaux BKCa qui sont localisés à proximité menant à la formation de courants potassiques sortants transitoires (STOCs) induisant une hyperpolarisation qui limite la vasoconstriction. En revanche, ils ne semblent pas participer à la mise en place du potentiel de repos en condition normale.

Ils sont bloqués à des concentrations millimolaires par les ions tetraethylammonium, par des toxines de scorpion telle la charybdotoxine, et plus sélectivement par l'ibériotoxine par un mécanisme bimoléculaire d'occlusion du pore. L'ibériotoxine est une toxine polypeptidique de 37 acides aminés qui comporte dans sa structure 3 ponts disulfures purifiée à partir du venin de scorpion *Buthus tamulus*. L'activateur le plus connu est le NS 1619.

Au niveau du muscle lisse vasculaire, ce type de canal est très bien représenté. Les sous unités α Slo 1 forment le pore et les sous unités auxiliaires Slo β 1 modulent la sensibilité au Ca²⁺ du canal.

L'activation des BKCa suite à la vasoconstriction, peut cependant être modulée par des voies intracellulaires faisant intervenir la PKC, qui est susceptible de diminuer leur activité. D'autres modulations sont possibles avec la phosphorylation par des cSrc tyrosines kinases activées par des agents vasoconstricteurs telle que la sérotonine. A l'inverse, activation de ces canaux est possible par l'action de vasodilatateurs (NO, époxydes de l'acide

arachidonique) soit par action directe (NO) soit par l'activation des protéines kinases intracellulaires PKA et PKG (**Figure 29B**) (Ko *et coll.*, 2008).

V.B.4 Les canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP})

Les canaux K_{ATP} des myocytes vasculaires sont formés de 4 sous unités α (Kir6.1) organisées en tétramère qui forment le pore du canal. Cet ensemble est complété de sous unités β appartenant à la famille de protéines ABC membranaires fixant l'ATP (les protéines ATP Binding Cassette). Il s'agit dans ce cas de la sous unité SUR 2B (sulphonylurea receptor) qui est une protéine constituée de 17 segments transmembranaires groupés en 3 domaines pourvus de 2 sites de liaisons des nucléotides NBF1 et NBF2 (Nucleotide binding fold) (**Figure 30A**) (Rosenblum, 2003).

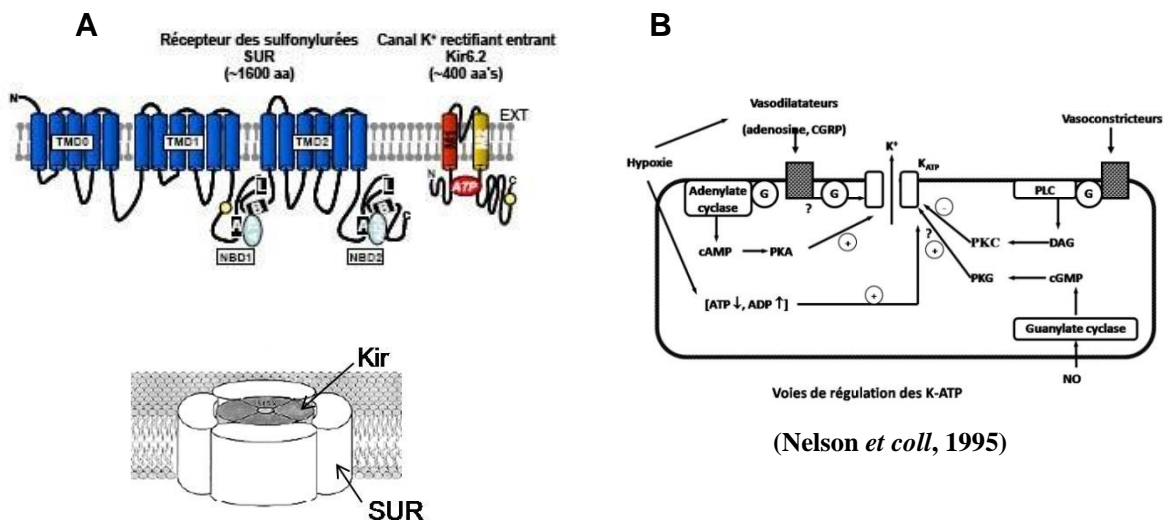


Figure 30: Structure générale des K_{ATP} et leurs voies de régulation

Leur ouverture, indépendante du potentiel membranaire et du temps, entraîne une hyperpolarisation dès que le statut énergétique de la cellule (changements du rapport ATP/ADP) atteint des valeurs critiques. Ces canaux couplent le potentiel membranaire de la cellule, et donc l'activité cellulaire, à l'état métabolique. La liaison de l'ATP intracellulaire induit une conformation fermée, et c'est la diminution du taux intracellulaire en ATP reflétant l'état métabolique qui va provoquer le changement conformationnel induisant le passage des ions K^+ . Ce type de régulation métabolique induit l'une des fonctions principales de ces canaux qui est de réduire l'excitabilité cellulaire lorsqu'un déficit énergétique apparaît. En condition physiologique, ces canaux sont majoritairement silencieux et interviennent peu dans le maintien du potentiel de repos.

Ils sont bloqués sélectivement par des composés de la famille des sulfonyles (glibenclamide) et ouverts par des activateurs tels que le diazoxide et le cromakalim. Tous les ouvreurs de canaux K_{ATP} induisent un courant K^+ sortant de faible conductance (10 à 20 pS),

entraînant l'hyperpolarisation de la cellule musculaire lisse avec pour conséquence fonctionnelle sa relaxation.

Ces canaux sont la cible de nombreuses substances vasodilatatrices endogènes (CGRP, adénosine, prostacycline, NO) passant par les voies de la PKA et PKG. Les influences vasoconstrictrices (endothéline, vasopressine,...) vont tendre à les inhiber par les voies de la PKC ou par une augmentation du calcium intracellulaire via la calcineurine (**Figure 30B**) (Ko *et coll*, 2008).

V.B.5 Les canaux TRP

Les canaux TRP (transient receptor potential) peuvent être classés, selon leur homologie de séquence, en au moins 3 grandes sous familles : les TRPV (vanilloid receptor-related), les TRPC (classical or canonical receptor-related) et les TRPM (melastatin receptor-related). Ce sont des protéines possédant 6 segments transmembranaires qui s'assemblent le plus souvent sous forme d'hétérotétramères (**Figure 31A**). L'extrémité amino-terminale possède au moins 3 motifs répétés d'ankyrines (notamment pour les TRPC), famille de protéines qui permettent l'interaction du canal avec le cytosquelette de la cellule (Brayden *et coll*, 2008). L'extrémité carboxy-terminale possède quant à elle des motifs riches en proline. Le segment S4 porte peu voire pas de charges positives, caractéristique des canaux affichant une faible voltage-dépendance. Certains possèdent plusieurs régions de fixation à la calmoduline pouvant les faire interagir avec le Ca^{2+} intracellulaire.

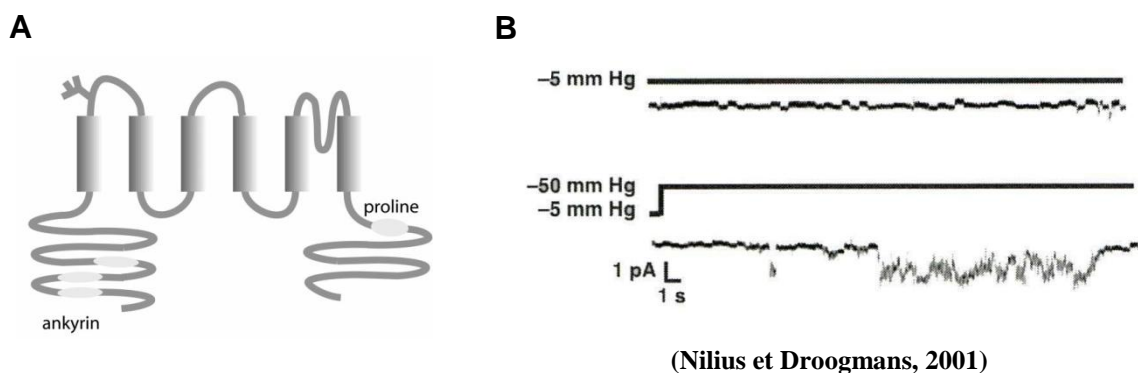


Figure 31: Structure générale des TRP et exemple d'activation mécanosensible (TRPM4)

Ils sont peu sélectifs et laissent passer des cations monovalents ou divalents. Ils sont activés par des stimuli variés, tels que des changements de température, de pression, d'osmolarité, de variations de concentration en Ca^{2+} intracellulaire, et par des acides gras (**Figure 31B**). Ils peuvent être aussi activés par une interaction avec des récepteurs couplés le plus souvent à des protéines G et impliqués dans la voie de la phospholipase C (Clapham, 2003; Nilius *et coll*, 2001).

V.B.6 Les canaux potassiques à deux domaines P (K2P)

Ces canaux sont particuliers dans leur structure car leur sous unité α formé de 4 segments transmembranaires possède 2 domaines P compris respectivement entre les segments S1-S2 et S3-S4. Deux sous unités α s'organisent pour former un canal fonctionnel à 2 pores laissant passer sélectivement les ions K^+ (**Figure 32A**). Ils font partie d'une grande famille qui possède au moins 12 membres dont 5 sont activés par l'acide arachidonique : les TWIK-2 (tandem of P domains in weak inward rectifier K^+), les TREK-1 et TREK-2 (TWIK-related K^+), les TRAAK (TWIK-related Arachidonic Acid stimulated K^+) et les THIK-1 (TWIK-related halothane inhibited K^+). Il existe à ce jour très peu d'inhibiteurs et d'activateurs spécifiques de cette famille de canaux rendant leur étude difficile.

Ils sont généralement actifs dans les gammes de potentiels négatifs et contribuent au maintien du potentiel de repos de la cellule. Ils sont susceptibles d'être modulés par une multitude de facteurs, comme les lipides agissant sur la membrane, les anesthésiques (halothane), les variations de température et de pH, les stimuli mécaniques et par des protéines kinases intracellulaires (PKA, PKC) (**Figure 32B**).

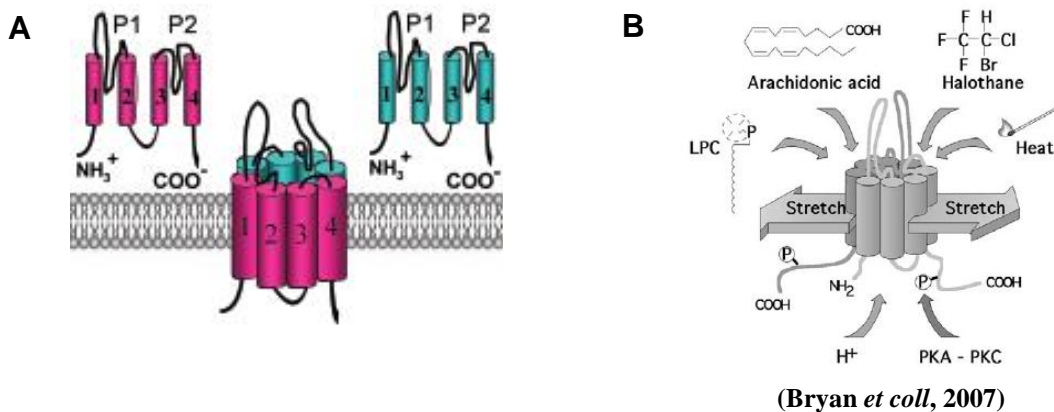


Figure 32: Structure générale des canaux potassiques à deux domaines transmembranaires

Les canaux TWIK-2 puis TREK-1 ont été successivement décrits comme étant exprimés au niveau des artères cérébrales et sont spécifiquement activés par des acides gras polyinsaturés (PUFAs) tel l'acide α -linoléique provoquant une vasodilatation de l'artère basilaire, ne faisant pas intervenir un mécanisme dépendant du NO et des prostacyclines (Blondeau *et coll*, 2007; Bryan *et coll*, 2006). Ils affichent un courant rectifiant sortant dû au blocage du courant entrant par des ions Mg^{2+} externes et par un mécanisme voltage dépendant intrinsèque au canal. Cependant, malgré cette dernière propriété, ils sont considérés comme des canaux potassiques de fuite et sont ouverts dans une large gamme de potentiels (Maingret *et coll*, 2002).

VI. Influences physiologiques exercées sur le muscle lisse vasculaire cérébral

VI.A. L'influence du compartiment endothélial

De part sa position stratégique, l'endothélium vasculaire n'est pas seulement une simple barrière anatomique entre le sang circulant et les myocytes vasculaires, mais il joue également un rôle essentiel dans une multitude de régulations physiologiques fondamentales comme les mécanismes d'angiogenèse et de réparation des dommages vasculaires et aussi le contrôle du tonus vasculaire.

Il est en effet capable de libérer des facteurs vasoactifs en réponse à différents stimuli biochimiques (peptides, neuroamines...) ou mécaniques (forces de cisaillement, pressions dues au flux sanguin). Ces influences vasorelaxantes agissent soit en activant la synthèse de monoxyde d'azote (NO), soit en favorisant la libération de prostacyclines (PGI₂) ou encore de substances hyperpolarisantes (EDHF), alors que d'autres au contraire, induisent une contraction avec notamment la libération d'endothélines (ET-1).

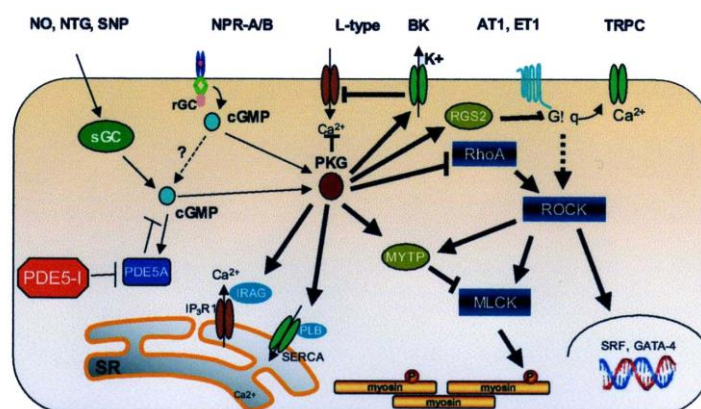
VI.A.1. Le monoxyde d'azote (NO) et la voie GMPc/PKG

Sans doute l'acteur le plus important des substances endothéliales, le NO fut appelé (EDRF) en raison de ses propriétés d'induire une relaxation endothélium dépendante (Furchgott et Zawadzki, 1980). C'est un radical libre gazeux jouant le rôle de médiateur-relais pour de nombreuses substances relaxantes du muscle lisse vasculaire comme la bradykinine, l'histamine, la sérotonine, l'acétylcholine et l'ATP. Sa production est assurée par la transformation de l'acide aminé L-arginine en L-citrulline par la NO synthétase (NOS). Trois isoformes de la NOS ont été identifiées et sont issues de gènes différents. Deux formes constitutives et dépendantes de la concentration de calcium intracellulaire sont distinguées, au niveau neuronal (nNOS ou NOS 1) et endothélial (eNOS ou NOS 3). Leur activation semble être sous la dépendance de plusieurs mécanismes passant le plus souvent par une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Presta et coll, 1997). La troisième forme (iNOS ou NOS 2) est inductible essentiellement dans des conditions de stress pathologique et ne dépend pas du calcium intracellulaire. Elle est en condition normale exprimée dans le cerveau immature et retrouvée dans les cellules gliales. Son caractère inductible ne doit pas occulter son importance physiologique car son activation permet la synthèse de 100 à 1000 fois plus de NO que celle produite par la NOS neuronale (Pannu et Singh, 2006).

En conditions basales, sa libération est continue et permet de réguler efficacement le débit sanguin cérébral. Le NO formé par la NOS 3 diffuse de l'endothélium jusqu'aux cellules musculaires lisses où la guanylate cyclase soluble représente sa principale cible. Celle-ci est une protéine hétérodimérique $\alpha\beta$ possédant un groupe prosthétique (hème ferreux) situé sur la sous unité β et un site catalytique formé par l'association des 2 sous unités. La fixation du NO sur ce site va induire la production de guanosine 3',5' monophosphate cyclique (GMPc) à partir de GTP (Poulos, 2006). L'augmentation de la concentration en GMPc, qui représente le second messenger principal de la voie du NO, active à son tour une protéine kinase G (PKG) qui semble être le carrefour d'une cascade de multiples phosphorylations de cibles intracellulaires conduisant à la relaxation du muscle lisse (**Figure 33**).

La PKG agit directement ou indirectement en diminuant la concentration cytosolique en calcium libre par l'activation des SERCAs suite à la phosphorylation du phospholambane, par l'inhibition des canaux ioniques calciques voltage-dépendants et des récepteurs couplés à une protéine G activés par le calcium ainsi que par l'activation des BKCa. La PKG a également comme cible l'appareil contractile du myocyte, en réduisant sa sensibilité au calcium par action sur la MLCP et en modulant les protéines associées aux filaments fins d'actine comme nous l'avons déjà vu. La PKG phosphoryle aussi une protéine associée au récepteur à l' IP_3 , l'IRAG (IP₃ Receptor-Associated-PKG substrat) permettant de limiter la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique (Kass et coll, 2007).

En plus de ces mécanismes dépendants du GMPc, des travaux ont mis en évidence que le NO pouvait dans certains territoires vasculaires induire une relaxation par l'activation directe de canaux potassiques du muscle lisse (Bolotina et coll, 1994).



(Kass et coll, 2007)

Figure 33: Participation du NO dans les voies intracellulaires de la relaxation du myocyte vasculaire

Compte tenu de la portée de l'action de la GMPc notamment sur l'activité de la PKG, sa concentration doit être particulièrement régulée par des mécanismes intracellulaires.

Son catabolisme dépend étroitement de l'activité de phosphodiésterases de nucléotides cycliques (PDE), l'isoforme PDE5 étant la plus exprimée au niveau du myocyte vasculaire (Matsumoto et coll, 2003).

La voie impliquant le GMPc et la PKG est considérée comme étant la plus représentée au niveau des artères cérébrales et des artérioles. Cependant un mécanisme supplémentaire menant à une vasorelaxation existe aussi dans lequel une forte concentration de NO inhibe la synthèse d'agents vasoconstricteurs de la famille des eicosanoïdes : le 20-HETE (Sun et coll, 2000).

VI.A.2. La prostacycline

La prostacycline (PGI₂), métabolite de l'acide arachidonique, est produite avec d'autres prostaglandines (E₂ et D₂) et thromboxanes par 2 cyclooxygénases (COX) appelées également prostaglandine H (PGH) synthétases. La COX-1 est exprimée de façon constitutive au niveau endothélial alors que la COX-2 est une forme inductible, selon les mêmes modalités d'activation de la NOS 2. Récemment, une troisième forme (COX-3) principalement exprimée dans les vaisseaux cérébraux a été découverte (Kis et coll, 2005).

Après sa synthèse, la PGI₂ diffuse vers le muscle lisse, où elle active essentiellement l'adénylate cyclase favorisant l'action de la protéine kinase A (PKA) via la production d'AMPc (Bogatcheva et coll, 2005). L'activation de la PKA provoque l'ouverture de canaux potassiques, en particulier les canaux K_{ATP}, et l'hyperpolarisation du myocyte (Parkington et coll, 2004). Celle-ci en plus de diminuer l'activité des canaux calciques voltage-dépendants induisant une diminution de la concentration en calcium intracellulaire, inhibe aussi la MLCK menant à la relaxation du muscle lisse et à la vasodilatation.

Cette relaxation est toutefois finement équilibrée par les différents métabolites de l'acide arachidonique puisque les prostaglandines (PGH₂) et les thromboxanes ont un effet vasoconstricteur en agissant sur la concentration intracellulaire de calcium dans les myocytes.

VI.A.3. Les substances hyperpolarisantes dépendantes de l'endothélium (EDHF)

En plus de l'action vasorelaxante du NO et de la prostacycline, il existe un autre mécanisme de relaxation induit par des agents vasoactifs, tels que l'acétylcholine et la bradykinine, dépendants de l'endothélium. Il se caractérise par une hyperpolarisation du muscle lisse induite par des facteurs libérés par l'endothélium (EDHF : endothelium-derived hyperpolarizing factor). Ce mécanisme persiste après l'inhibition des voies impliquant la NOS et les COX mais se trouve inhibé par l'application d'inhibiteurs de canaux potassiques,

suggérant que l'hyperpolarisation passe par l'activation de ceux-ci (Golding et coll, 2002). L'identité de ces facteurs endothéliaux est encore mal définie et fait l'objet de nombreuses investigations.

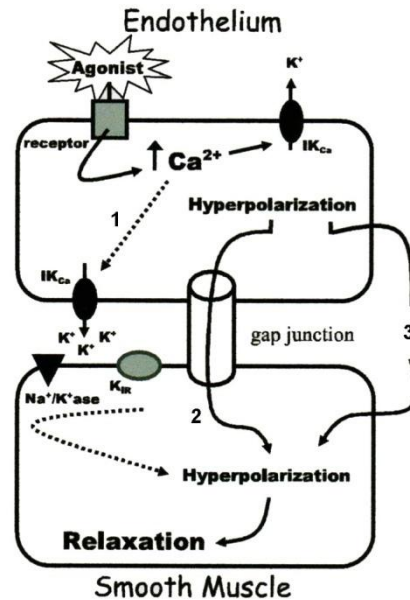
Dans tous les cas, il y a une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire de la cellule endothéliale. Cette augmentation est associée au niveau des artères cérébrales à une activation des canaux IK_{Ca} menant à une hyperpolarisation des cellules endothéliales et à une augmentation de la concentration extracellulaire en potassium (Marrelli, 2000; Marrelli, 2002; Marrelli et coll, 2003). Cette hyperpolarisation est transmise sur une distance relativement longue d'une part entre les cellules endothéliales par les gap junctions et d'autre part par les canaux de la famille des Kir (Kir2.1) exprimés au niveau endothélial et activés par l'augmentation en potassium extracellulaire. Ces derniers permettent ainsi d'amplifier le signal ionique déclenché par d'autres conductances potassiques et participent à la transmission de l'hyperpolarisation le long des cellules endothéliales de la microcirculation (Rivers et coll, 2001; Smith et coll, 2008). Au moins 3 voies de transmission de l'hyperpolarisation vers les myocytes vasculaires sont concernées par le mécanisme d'EDHF (**Figure 34**) :

- La phase d'hyperpolarisation pourrait être transmise au muscle lisse par les ions K^+ libérés par les canaux IK_{Ca} des cellules endothéliales en activant les canaux Kir et la pompe $Na^+-K^+-ATPase$ des myocytes. L'ion K^+ pourrait donc agir comme un EDHF et constituer la première voie comme indiqué sur la **Figure 34** (McNeish et coll, 2005).

- La transmission de l'hyperpolarisation et du signal vasorelaxant aux myocytes vasculaires serait aussi permise par la présence de jonctions myoendothéliales (myoendothelial gap junction) correspondant à la deuxième voie indiquée. Ces contacts s'établissent de manière discontinue au travers de la lame élastique interne et sont d'autant plus exprimés que le diamètre des vaisseaux diminue (Figuroa et coll, 2004). Les variations du potentiel de membrane des cellules endothéliales sont transmises aux myocytes, qui sont connectés entre eux par les gap junctions, induisant une coordination des réponses entre les cellules endothéliales et les myocytes menant à la modulation globale du tonus vasculaire (Sokoya et coll, 2006).

- Enfin, des études récentes ont proposé l'existence d'une troisième voie possible impliquant des produits du métabolisme de l'acide arachidonique par le cytochrome P-450 monooxygénase au sein de la cellule endothéliale, les acides epoxyeicosatriénoïques (EETs) (**Figure 34**). Ils joueraient le rôle d'EDHF en permettant d'induire, suite à leur libération, une vasorelaxation soit par l'activation des canaux BK_{Ca} par l'intermédiaire d'une

protéine G (G_{α}) soit par l'activation des canaux Kir et de la pompe Na^+/K^+ -ATPase des myocytes (Campbell et Falck, 2007). Une activation indirecte des BKCa par les TRPV4 est aussi observée menant là aussi à une hyperpolarisation du myocyte (Brayden *et coll*, 2008).



d'après (Andresen *et coll*, 2006)

Figure 34: Vasodilatation par l'EDHF des artères cérébrales

VI.A.4. L'endothéline

Par opposition aux facteurs responsables de la relaxation, l'endothélium est capable de libérer des substances vasoconstrictrices. Parmi les facteurs de contraction dérivés de l'endothélium (EDCF), l'endothéline (ET) a été la plus étudiée. Il existe 3 isoformes d'endothéline (ET-1, ET-2 et ET-3), mais seule l'ET-1 est produite en condition normale.

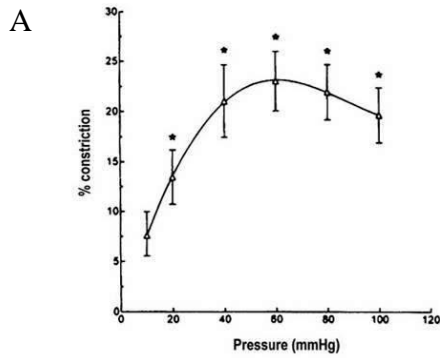
Les effets de l'ET-1 passent essentiellement par l'activation du récepteur ET_A , qui est exprimé essentiellement dans le muscle lisse. Sa stimulation produit une contraction faisant intervenir la voie de la phospholipase C et de l' IP_3 qui induit la libération du Ca^{2+} des stocks intracellulaires. ET-1 inhibe aussi la MLCP via l'activation de la voie Rho/Rho kinase et peut aussi activer les canaux chlores provoquant la vasoconstriction par l'augmentation d'un efflux d'ions Cl^- du myocyte (Dai et Zhang, 2004). Cependant, l'ET-1 n'apparaît pas contribuer à la régulation du débit sanguin cérébral, suggérant qu'il n'est pas libéré de l'endothélium en conditions normales (Koedel et coll, 1998).

VI.B. Le mécanisme d'autorégulation

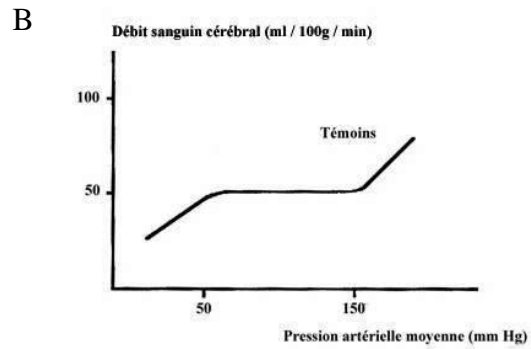
L'autorégulation peut se définir comme la propriété qu'ont les vaisseaux du cerveau de modifier activement leur diamètre, en réponse à une variation de pression de perfusion, ce qui a pour résultat de maintenir constant le DSC (Figure 35A). Il s'agit d'un

mécanisme physiologique de protection qui tend à éviter l'ischémie en cas de chute de la pression artérielle, d'empêcher les dommages capillaires et la formation d'œdème en cas d'augmentation de la pression artérielle (**Figure 35B**). Les seuils inférieurs et supérieurs d'autorégulation se situent chez l'homme sain aux alentours de 60 à 150 mm Hg de pression artérielle moyenne, au-delà, le DSC suit passivement les variations de la pression de perfusion. Ce mécanisme est présent sur les artères piales et les artères du polygone de Willis. Les systèmes de contrôle impliqués sont d'origine extrinsèque (influences nerveuses et hormonales) et intrinsèque (réponse myogénique et facteurs métaboliques) au muscle lisse.

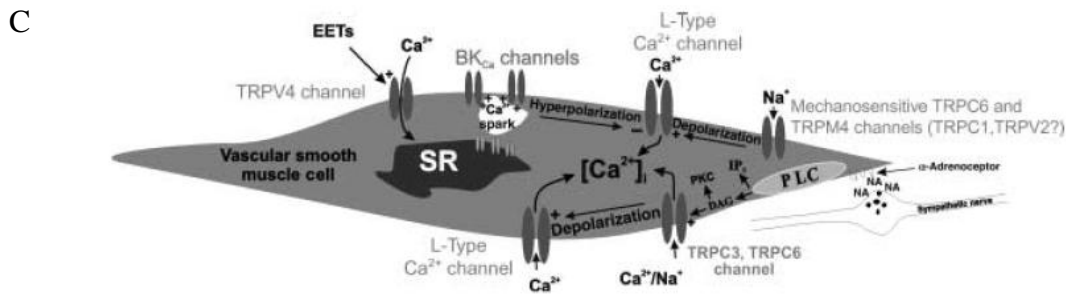
Les canaux ioniques de la famille des TRP des myocytes vasculaires sont impliqués dans la réponse myogénique des petites artères et des artérioles et participent au mécanisme d'autorégulation (**Figure 35C**). Les myocytes expriment notamment les isoformes TRPC6 et TRPM4 qui comme nous l'avons vu sont mécanosensibles. Il est proposé que ces deux types de canaux puissent interagir suite à l'augmentation de la pression intravasculaire. Les TRPC6 permettraient en effet l'activation d'un courant Ca^{2+} entrant qui activerait au voisinage un courant Na^+ entrant par les TRPM4 induisant une dépolarisation globale par l'activation finale des canaux calciques voltage-dépendants de type L (Brayden *et coll*, 2008).



Le tonus myogénique est une vasoconstriction spontanée en réponse à la pression



L'autorégulation du débit sanguin cérébral protège contre les fluctuations de la pression artérielle



Participation des canaux TRP dans le mécanisme d'autorégulation (Brayden et coll, 2008)

Figure 35: Exemples d'autorégulation d'une artériole

VI.C. L'influence nerveuse

De la périphérie vers les régions les plus profondes du cerveau, les myocytes des artères cérébrales sont en étroite interaction avec les fibres nerveuses qui ont soit pour origine respective les ganglions nerveux périphériques du système nerveux autonome, formant l'innervation extrinsèque, soit le tissu neuroglial agissant sur la microcirculation cérébrale et formant l'innervation intrinsèque.

VI.C.1. L'innervation extrinsèque

Elle est constituée de fibres provenant des systèmes nerveux sympathique et parasympathique et se terminent sous forme de varicosités axonales au niveau de la tunique moyenne et externe des grandes et petites artères cérébrales jusqu'au stade des artères piales (<50 μm) (Cohen et coll, 1997). A ce niveau, les fibres nerveuses autonomes ne réalisent pas de contact direct avec les fibres musculaires lisses mais forment des jonctions diffuses, qui

libèrent le neuromédiateur à quelques micromètres des myocytes qui diffuse ensuite à travers le muscle lisse (**Figure 36**).

La stimulation des neurofibres sympathiques prenant leur origine du ganglion cervical supérieur permet, par l'action d'agents vasoactifs tels que la norepinephrine et le neuropeptide Y (NPY), d'induire une diminution du DSC par un effet vasoconstricteur notamment sur les grosses artères cérébrales. La stimulation sympathique modifie surtout la réactivité vasculaire en réponse aux autres stimuli. Le processus d'autorégulation voit par exemple ses limites inférieures et supérieures de pression repoussées (décalage de la courbe DSC / pression vers la droite) conférant aux vaisseaux cérébraux une protection accrue contre les fortes poussées de tension systémique favorisées par une élévation du tonus sympathique.

Les neurofibres parasympathiques prennent quant à elles leur origine au niveau des ganglions otiques et ptérygo-palatins. Leurs effets sont médiés par l'acétylcholine, le NO et le VIP (vasoactive intestinal peptide). L'activation du système parasympathique mène à une vasodilatation, mais ne semble pas jouer de rôle majeur sur les réponses cérébrovasculaires en conditions normales. La voie nerveuse provenant du ganglion trigéminal représente l'unique innervation sensorielle des vaisseaux cérébraux. Elle a un rôle de protection qui permet de rétablir le tonus de base du vaisseau suite à une vasoconstriction préalable. Cette action vasodilatatrice est médiée par le CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) libéré par les nerfs trijumeaux. Cette composante interviendrait pendant les phases de migraine où elle serait suractivée provoquant une augmentation du DSC et de l'inflammation au niveau de la région de la dure-mère.

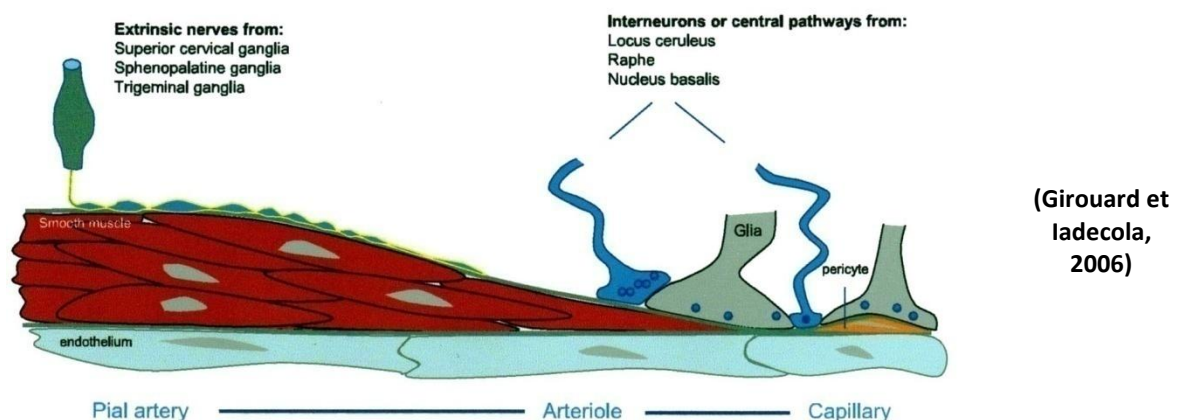


Figure 36: Innervation extrinsèque et intrinsèque du système vasculaire cérébral

L'ensemble de ces innervations, qui participe à la régulation du DSC, sont impliquées dans les situations d'hypertension et d'hypotension et de crises épileptiques.

VI.C.2. L'innervation intrinsèque

Au-delà de cette innervation extrinsèque qui s'établit jusqu'au stade des artères piales, la microcirculation cérébrale desservant en particulier la région corticale du tissu nerveux est régulée par deux composantes ayant respectivement une origine distale et locale. Ces vaisseaux qui pénètrent dans le tissu cérébral établissent des contacts avec les cellules gliales et avec les neurones sous forme d'unités neuro-glio-vasculaires fonctionnelles.

VI.C.2.a. La composante distale de l'innervation intrinsèque

La composante distale prend pour origine des centres nerveux situés plus en profondeur du cortex cérébral qui font projection sur la microcirculation cérébrale (**Figure 36**). Les plus connus sont ceux impliquant les régions sous corticales et du tronc cérébral (ganglions de la base, locus coeruleus et les noyaux du raphé), mais aussi du cervelet (noyau fastigial) et de la base du cerveau (noyau basal magnocellulaire) (Rancillac et coll, 2006). Globalement, toutes ces voies interagissent soit directement avec les myocytes des artérioles et les capillaires cérébraux, soit indirectement avec les astrocytes entourant ces vaisseaux. Dans ce dernier cas, le déclenchement de vagues calciques au sein des astrocytes semble intervenir suite à leur activation aboutissant à la réponse physiologique correspondant à l'innervation considérée.

Des récepteurs spécifiques aux agents vasoactifs libérés par les projections neuronales sont exprimés au niveau des cellules endothéliales, des myocytes et des astrocytes. Leur activation permet de moduler le DSC cortical en provoquant soit une vasodilatation soit une vasoconstriction. A titre d'exemple, citons les neurones des noyaux du raphé qui libèrent la sérotonine sur les microvaisseaux. L'activation des récepteurs à la sérotonine 5-HT_{1B} mène à la vasoconstriction par interaction directe avec les myocytes (Hamel, 2006).

VI.C.2.b. La composante locale de l'innervation intrinsèque

La composante locale d'origine essentiellement corticale implique les systèmes neuronaux et les interneurons du tissu neuroglial faisant projection sur les artérioles situées à proximité (Rancillac et coll, 2006). Une multitude de facteurs vasoactifs sont libérés, tels que le NO et le VIP qui induisent une vasodilatation, mais aussi l'acétylcholine, le GABA qui peuvent induire des réponses différentes et la PGE₂. Ces médiateurs peuvent modifier directement le calibre des vaisseaux de façon fine et rapide, comme c'est le cas dans l'hyperémie fonctionnelle, pour ajuster étroitement le DSC à la demande fonctionnelle du tissu cérébral. Les interneurons corticaux pourraient en fait constituer un relais au sein du

cortex cérébral permettant de moduler le DSC en fonction de l'activité des centres sous corticaux (**Figure 36**).

VI.D. L'hyperémie fonctionnelle

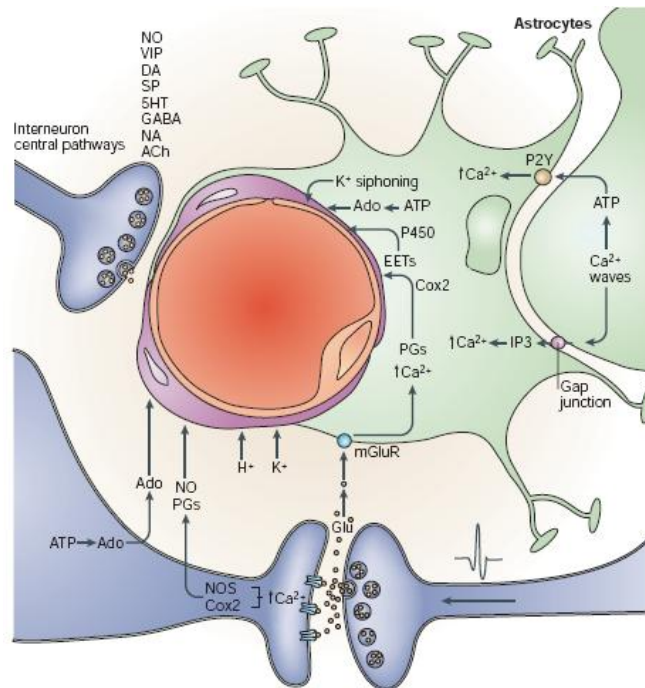
Le tissu cérébral ne possédant pas de réserves énergétiques, il requiert un débit sanguin minimal et contrôlé pour s'adapter notamment à son activité. Environ 80% du DSC est dévolu à l'activité neuronale, à la synthèse et au recyclage des neurotransmetteurs. Un DSC contrôlé est donc requis pour la réalisation dans les meilleures conditions de l'activité cérébrale, en permettant d'apporter les équivalents énergétiques essentiels et d'éliminer les métabolites issus de cette activité, tels que le CO₂ et le lactate. L'hyperémie fonctionnelle correspond à l'augmentation du DSC observée suite à l'augmentation de l'activité cérébrale, intégrant l'idée d'un couplage neurovasculaire. Nous allons voir que des intermédiaires interviennent pour réaliser ce couplage, comme les neurotransmetteurs libérés lors de l'activité synaptique tel que le glutamate et les ions K⁺ qui activent les canaux potassiques Kir2.x des myocytes vasculaires.

VI.D.1. L'activité synaptique contrôle le DSC

En effectuant leur rôle de cellules support de la propagation de l'influx nerveux au niveau des synapses chimiques, les neurones et les astrocytes qui entourent les synapses libèrent des neurotransmetteurs vasoactifs tels que l'acétylcholine, le GABA, les catécholamines et des neuropeptides.

D'autres neurotransmetteurs, comme le glutamate, n'ont pas de propriétés vasoactives directes mais stimulent la synthèse et la libération de puissants vasodilatateurs comme le NO et les métabolites des epoxygénases P450 et des COX-2 tant au niveau neuronal qu'astrocytaire (Buerk et coll, 2003) (**Figure 37**). Au niveau neuronal, la fixation du glutamate sur les récepteurs NMDA induit une activation de voies intracellulaires dépendantes du calcium intracellulaire. La nNOS est ainsi activée menant à la synthèse de NO agissant directement sur les myocytes vasculaires. La fixation du glutamate sur son récepteur métabotropique au niveau des prolongements pérисynaptiques astrocytaires déclenche une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium qui se propage comme une vague calcique jusqu'aux prolongements astrocytaires interagissant avec les myocytes. Celle-ci active la phospholipase A2 menant à la production d'acide arachidonique qui est métabolisé selon deux voies bien distinctes : la voie des COX (notamment l'isoforme COX-2) et la voie des P450 epoxygénases qui mènent respectivement à la libération de prostaglandines (PGE₂)

et d'acides epoxyeicosatriénoïques (EETs) (Iadecola, 2004). Ces deux voies conduisent à la vasodilatation par action sur les myocytes au niveau artériolaire via les canaux potassiques. D'autres médiateurs, différents des neurotransmetteurs, agissent aussi au niveau de l'unité neuro-glio-vasculaire comme l'adénosine, les ions H^+ et K^+ .



(Iadecola, 2004)

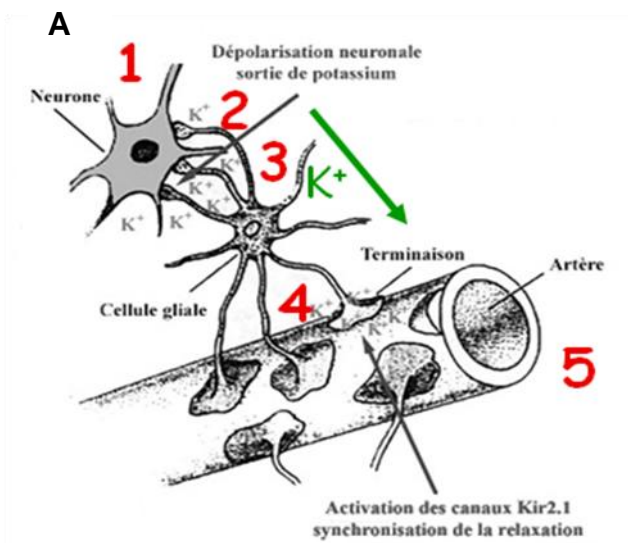
Figure 37: Les agents vasoactifs libérés par les neurones et les astrocytes lors de l'activité synaptique

L'augmentation du métabolisme de l'ATP associée à l'activité neuronale conduit à la production d'adénosine, puissant vasodilatateur, libérée dans le milieu extracellulaire par des transporteurs spécifiques (Ilf et coll, 2003). Elle a un effet direct au niveau des myocytes par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques A_{2A} et A_{2B} . En plus de cette action directe sur le muscle lisse, l'adénosine agit aussi sur les astrocytes. L'ATP circule entre les astrocytes et est libéré par les gap junctions. La fixation sur son récepteur purinergique spécifique (P2Y) induit des vagues calciques à l'origine des effets décrits précédemment. L'adénosine potentialise l'effet de ces vagues calciques induites par l'ATP par l'activation de récepteurs A_{2B} menant à une augmentation de la concentration en AMPc et à une libération encore plus massive de Ca^{2+} dans l'astrocyte (Koehler et coll, 2006).

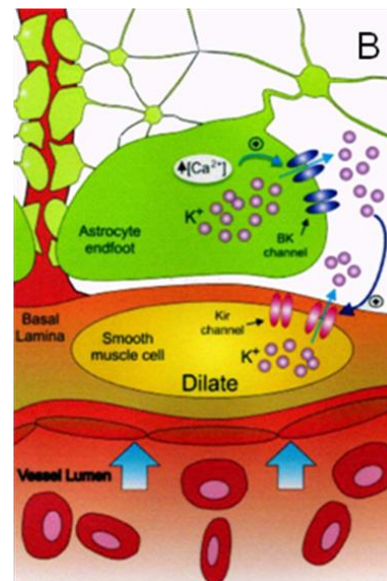
L'acétylcholine libérée au niveau des synapses peut agir indirectement en augmentant la synthèse de NO par les cellules endothéliales comme le fait la glutamine, mais peut aussi agir directement sur les péricytes des capillaires pour produire une vasodilatation (Wu et coll, 2003; Zhang et coll, 1995).

VI.D.1.a La relaxation potassium-dépendante

L'ion K^+ constitue une autre voie de couplage neurovasculaire. La relaxation K^+ dépendante est une composante d'un mécanisme appelé "potassium siphoning" reposant sur les mouvements d'ions K^+ partant des neurones actifs puis interagissant via les astrocytes sur les myocytes des vaisseaux cérébraux. L'activation neuronale libère en effet dans l'espace extracellulaire, au niveau des synapses et des nœuds de Ranvier, une grande quantité de potassium lors de la phase de repolarisation assurée par des canaux potassiques dépendants du potentiel. Cette augmentation de la concentration extracellulaire en potassium favorise l'hyperexcitabilité du neurone et doit être prise en charge afin de protéger l'activation neuronale de l'auto-activation. Les astrocytes recaptent immédiatement l'excès de potassium par des systèmes de transport incluant des canaux Kir (homomères d'isoformes Kir2.1 et hétérotétramères Kir4.1/Kir2.1 ou Kir5.1) et le redistribuent dans des sites présentant une faible concentration extracellulaire de potassium par des canaux Kir4.1, au niveau des prolongements astrocytaires interagissant avec les artérioles cérébrales (Butt et Kalsi, 2006).



(Bastide *et coll*, 2007)



(Gordon *et coll*, 2007)

- 1- Activité neuronale
- 2- Sortie de K^+
- 3- " K^+ siphoning"
- 4- Augmentation locale en K^+ extracellulaire
- 5- Vasodilatation induite par l'activation des canaux Kir2.x des myocytes vasculaires
⇒ Augmentation du DSC

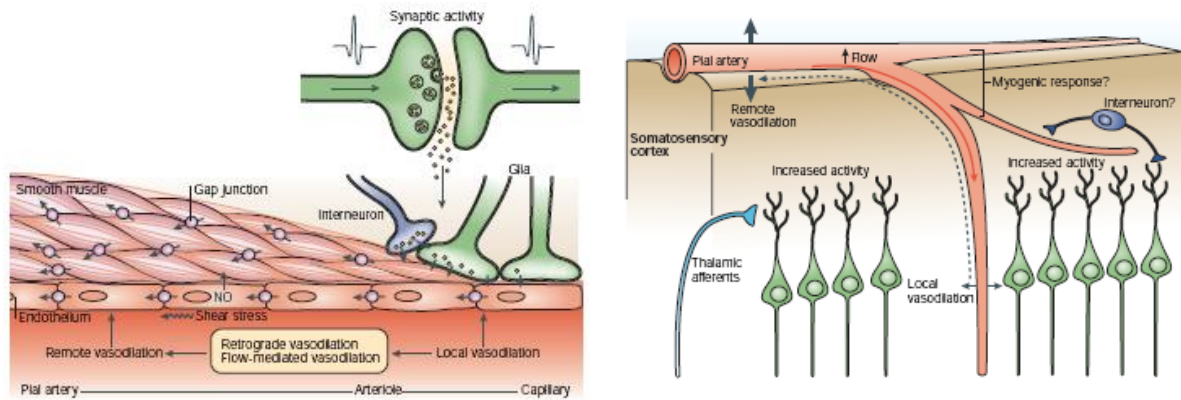
Figure 38: Mouvements de K^+ au sein de l'unité-neuro-glio-vasculaire

L'augmentation localisée en potassium extracellulaire entraîne l'activation du courant Kir2.x des myocytes vasculaires, induisant par l'hyperpolarisation l'inactivation des canaux calciques voltage-dépendants, une diminution de la concentration intracellulaire en calcium et une vasodilatation de l'artériole considérée (**Figure 38A**). L'ion K^+ agirait donc comme un médiateur du couplage entre l'activité neuronale et le DSC. Ce mécanisme serait en fait concomitant avec celui menant à la formation de vagues calciques dans les astrocytes suite à l'activité synaptique. Cette augmentation de concentration en calcium au niveau des prolongements astrocytaires permettrait en plus de la libération des facteurs vasoactifs décrits précédemment, l'activation de canaux potassiques dépendants du calcium intracellulaire KCa qui aboutirait là aussi à une vasodilatation des artérioles suite à la libération d'ions K^+ à proximité des myocytes (**Figure 38B**) (Filosa et coll, 2006).

Ces deux mécanismes, l'un reposant sur les mouvements de K^+ au sein de l'unité neuro-glio-vasculaire et l'autre menant à l'activation des canaux KCa et à la libération d'agents vasoactifs, pourraient se moduler l'un l'autre pour obtenir au final un couplage neurovasculaire efficace (Filosa et Blanco, 2007).

VI.D.1.b. La propagation rétrograde de la vasodilatation

Les artères piales situées à la surface du cerveau assurent l'approvisionnement et constituent le principal lieu de contrôle du DSC qui est retrouvé dans la microcirculation cérébrale. Les différents mécanismes qui interviennent lors de l'activité neuronale évoqués précédemment aboutissent à une vasodilatation localisée au site d'activation. Pour que le DSC soit en relation avec cette activation locale, il doit donc y avoir la réalisation en amont d'ajustements vasculaires au niveau des artères piales permettant l'hyperémie fonctionnelle (**Figure 39**). Ces ajustements vasculaires, se traduisant sous la forme de variations oscillantes du diamètre de l'artère piale reliées à l'activité cérébrale, est dénommée sous le mécanisme de vasomotion (Vetri et coll, 2007).



(Iadecola, 2004)

Figure 39: Les mécanismes cellulaires de la propagation rétrograde de la vasodilatation

Les mécanismes impliqués dans cette propagation rétrograde de la vasodilatation feraient intervenir les cellules endothéliales et les myocytes vasculaires qui sont connectés entre eux par les gap junctions. Cette propagation de la vasodilatation provoquerait une augmentation localisée de la vitesse d'écoulement du sang et des forces de cisaillement sur les cellules endothéliales amenant à la libération de facteurs endothéliaux relaxants renforçant la vasodilatation initiale (Iadecola, 2004; Lok et coll, 2007).

VII. La physiopathologie de l'ischémie-reperfusion cérébrale

VII.A. Les accidents vasculaires cérébraux

VII.A.1. Définition

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) constituent l'un des principaux problèmes de santé publique dans les pays industrialisés. Ils représentent en effet la deuxième cause de mortalité après les maladies coronariennes et sont par ailleurs la première cause de handicap et la deuxième cause de démence chez l'adulte. L'incidence de cette pathologie est estimée en France entre 2 et 3 pour 1000 habitants par an (100 000 à 150 000 nouveaux cas chaque année) (Donnan *et coll*, 2008).

L'ischémie cérébrale est due à une interruption ou à une réduction sévère du flux sanguin dans un territoire vasculaire précis, et suffisamment prolongée pour entraîner des altérations du tissu cérébro-vasculaire. Deux types d'accidents vasculaires cérébraux sont distingués : les accidents ischémiques, qui sont de loin les plus fréquents (80 % des cas), et les accidents hémorragiques. Les accidents ischémiques vasculaires entraînent une hypoxie ainsi qu'une diminution des métabolites essentiels à la survie tissulaire. Les accidents vasculaires de type hémorragique provoquent l'extravasation sanguine intracrânienne et causent une destruction du parenchyme cérébral.

Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés : il peut s'agir de facteurs inhérents à l'individu comme l'âge, le sexe, le style de vie (alimentation, tabac, alcool, contraceptifs oraux etc...), l'anomalie de certains grands systèmes physiologiques (pression artérielle, métabolisme lipidique et glucidique etc...), ou à l'environnement (facteurs météorologiques, pollution de l'air liée notamment aux pics d'ozone) (Bejot *et coll*, 2007). Certains de ces facteurs sont contrôlables à l'échelon individuel ou à l'échelon d'une population et leur suppression constitue une priorité en matière de prévention de l'AVC.

VII.A.2. Les facteurs prédisposants

VII.A.2.a. L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est considérée comme le plus important des facteurs de risque des AVC et concerne un cas d'accident vasculaire sur deux (Giroud *et coll*, 2004). Les risques d'AVC et de cardiopathie ischémique augmentent en effet avec la pression artérielle diastolique (MacMahon *et coll*, 1990). C'est pourquoi une diminution de l'incidence des AVC peut être mise sur le compte d'une meilleure prise en charge de l'hypertension artérielle sans toutefois qu'un parallélisme strict entre ces deux paramètres ne soit toujours observé

(Broderick et coll, 1989). L'hypertension artérielle provoque en effet la formation de plaques d'athérome au niveau des artères et des artérioles cérébrales pouvant mener à une occlusion artérielle (Dahlof, 2007; Lammie, 2002). De plus, elle induit une nécrose fibrinoïde (dépôt de fibrine dans la paroi du vaisseau) au niveau des artères et artérioles pénétrantes qui peuvent résulter en la formation d'infarctus ou d'hémorragies cérébrales (Lammie, 2002).

VII.A.2.b. Le tabac

La consommation de tabac, ainsi que l'exposition passive, augmente le risque de survenue d'un AVC par artériopathie extra ou intracrânienne. Après 60 ans, le risque relatif vis-à-vis des lésions sévères d'athérosclérose carotidienne est multiplié par 2 après plus de 20 ans d'intoxication et par 3,5 après plus de 40 ans (Shinton et Beevers, 1989). Toutefois, l'arrêt de l'intoxication tabagique entraîne une diminution rapide de ce risque. Si le risque relatif (RR) d'AVC lié au tabac est modéré par rapport à celui lié à l'hypertension artérielle (RR = 1.5 versus 4), la fréquence de l'intoxication tabagique dans la population générale en fait un facteur de risque de premier plan.

VII.A.2.c. Les cardiopathies

La présence d'une cardiopathie ischémique (infarctus du myocarde ou angine de poitrine), d'une insuffisance cardiaque ou d'une hypertrophie ventriculaire gauche s'accompagne d'un risque accru d'AVC. Le mécanisme à l'origine de l'accident ischémique cérébral est souvent difficile à préciser en raison de la coexistence relativement fréquente d'autres facteurs de risque vasculaire (hypertension artérielle, lésions artérielles). On estime néanmoins qu'une embolie d'origine cardiaque est la cause la plus vraisemblable d'un AVC ischémique dans 20% des cas.

VII.A.2.d Les dyslipidémies

Le lien entre cholestérol et AVC est complexe, le rôle de l'hypercholestérolémie comme facteur de risque neurovasculaire étant resté longtemps controversé. Cependant, des études récentes ont pu démontrer l'existence d'un lien entre augmentation du cholestérol total, augmentation du LDL-cholesterol, diminution du HDL-cholesterol d'une part et augmentation du risque de survenue d'un accident ischémique cérébral. Cette donnée justifie l'étude actuelle des effets en prévention secondaire et/ou primaire d'agents hypolipémiants, en particulier des fibrates et des statines, dans la pathologie ischémique cérébrale (Castilla Guerra *et coll*, 2008; Deplanque *et coll*, 2006).

VII.A.3. Autres facteurs de risque

Le rôle du diabète comme facteur de risque des AVC de type ischémique est désormais établi, avec un risque relatif estimé entre 1,5 et 2. Les résultats des études sur la relation entre la consommation d'alcool et le risque d'AVC sont contradictoires. L'augmentation du risque d'AVC de type hémorragique chez l'alcoolique est plus clairement établie avec peut-être une relation dose-effet. Le régime alimentaire peut également constituer un facteur de risque d'AVC dans la mesure où il modifie d'autres paramètres comme la pression artérielle. Ainsi, un régime riche en sodium, une faible consommation de potassium, une surcharge pondérale et l'alcool semblent associés à une élévation de la pression artérielle.

VII.B. Origines d'un infarctus cérébral ischémique

La diminution du débit sanguin cérébral à l'origine du développement des lésions ischémiques, voire d'un infarctus cérébral, peut résulter de causes et de mécanismes divers. Trois mécanismes principaux sont à retenir : le mécanisme embolique artério-artériel ou d'origine cardiaque, le mécanisme hémodynamique et l'atteinte des artères perforantes.

VII.B.1 Mécanisme embolique

Le mécanisme embolique, surtout évoqué par une symptomatologie neurologique d'apparition brutale, semble être le plus souvent impliqué dans la pathogénie des infarctus cérébraux (Pessin et coll, 1979). Il peut s'agir d'une embolie fibrino-plaquettaire à partir d'un thrombus blanc consécutif à l'adhésion des plaquettes sur une plaque d'athérome ulcérée, d'une embolie fibrino-cruorique provenant de la fragmentation d'un thrombus rouge à partir d'une plaque d'athérome ulcérée ou d'un thrombus mural formé dans une cavité cardiaque ou encore, ce qui est plus rare, de la migration à travers un foramen ovale perméable d'un thrombus veineux profond (Bogousslavsky et coll, 1996). Il peut s'agir aussi d'une embolie de cholestérol provenant du contenu athéromateux de la plaque, migrant dans la circulation à l'occasion de la rupture de celle-ci, d'une exceptionnelle embolie calcaire à partir d'un rétrécissement aortique calcifié ou encore de l'embolie de matériel septique dans le cadre d'une endocardite infectieuse. Enfin, il faut signaler la possibilité là encore exceptionnelle d'embolie artérielle de cellules néoplasiques à partir d'un néoplasme profond ou d'une tumeur intracardiaque tel un myxome. En imagerie, il est habituel de considérer que les infarctus cérébraux consécutifs à un mécanisme embolique sont le plus souvent des infarctus touchant le territoire de l'une des grosses artères intracrâniennes (sylvienne, cérébrale antérieure, cérébrale postérieure...) (Ringelstein et coll, 1989). Ceci n'a cependant aucun caractère exclusif et il faut garder à l'esprit que le diagnostic du mécanisme de l'accident ischémique

cérébral, en dehors de l'imagerie, reste basé sur un faisceau d'arguments cliniques ainsi que sur les résultats des explorations vasculaires.

VII.B.2. Mécanisme hémodynamique

L'accident hémodynamique est surtout évoqué lorsque la symptomatologie neurologique déficitaire est fluctuante, en particulier lorsque cette fluctuation clinique est corrélée aux changements de position (lever brusque, passage en station assise) ou lorsque celle-ci est associée à une diminution de la pression artérielle, quelle qu'en soit la cause. Ce type de mécanisme s'observe parfois en cas de rétrécissement sévère d'une grosse artère à destinée cérébrale, en particulier en cas d'athérome (Bogousslavsky et Regli, 1986). Il est par ailleurs possible que ce type de mécanisme intervienne lors d'infarctus en rapport avec un hémio-détournement, tel par exemple un vol sous-clavier (obstruction de l'artère sous clavière en amont de l'origine de l'artère vertébrale), ou encore à l'occasion d'un choc cardiogénique (Torvik et Skullerud, 1976). En dehors d'infarctus siégeant dans le territoire des gros vaisseaux, ce type de mécanisme serait plutôt responsable du développement d'infarctus jonctionnels, à savoir des infarctus touchant de manière préférentielle la jonction de deux territoires artériels (Bogousslavsky *et coll*, 1986). Les infarctus consécutifs à un choc cardiogénique sont le plus souvent des infarctus bilatéraux, parfois de type jonctionnel ou encore touchant préférentiellement les noyaux gris centraux (Collins *et coll*, 1989).

VII.B.3. Atteinte des artères perforantes

L'atteinte des artères perforantes est le plus souvent consécutive à une pathologie de la paroi artérielle sous la forme d'une lipohyalinose dans le contexte d'une hypertension artérielle ou d'un diabète (You *et coll*, 1995). La pathologie de ces petites artères se traduit cliniquement par le développement de lésions ischémiques dites lacunaires (infarctus cérébraux de petite taille) ou par la survenue d'hémorragies profondes. Il semblerait que l'infarctus soit déterminé par l'obturation de l'une des branches perforantes profondes mais le mécanisme précis de la constitution de tels infarctus demeure encore discuté (Horowitz *et coll*, 1992). Chez certains patients, ces lésions lacunaires peuvent être multiples. Dans ce contexte, la survenue d'une nouvelle lésion est parfois de diagnostic difficile. Les séquences d'IRM de diffusion permettent d'en faciliter le dépistage (Schonewille *et coll*, 1999).

VII.B.4. Autres mécanismes

Parmi les mécanismes évoqués lors de la survenue d'un infarctus cérébral, deux doivent encore être cités. D'une part, le spasme artériel, qui complique fréquemment les hémorragies méningées, est une cause d'infarctus cérébral chez les patients ayant présenté une

rupture de malformation vasculaire cérébrale. Dans ce contexte, la mise en jeu de vasoconstricteurs puissants comme l'endothéline a été évoquée (Cook, 1995). D'autre part, un état d'hyperviscosité sanguine, secondaire par exemple à un syndrome polyglobulique ou à la présence d'une protéine monoclonale anormale en grande quantité dans le sang peut constituer un facteur favorisant ou aggravant de l'infarctus cérébral (Fisher et Meiselman, 1991).

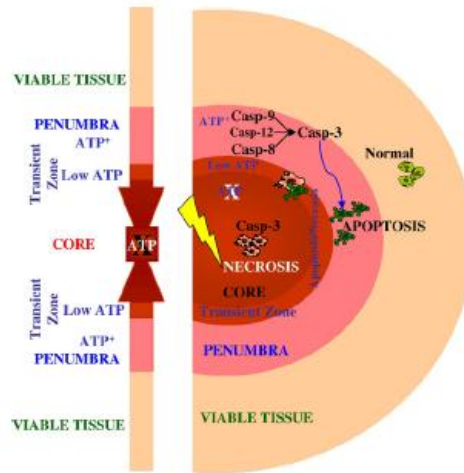
Si le mécanisme responsable de l'infarctus cérébral va guider la conduite thérapeutique à tenir, en particulier la fibrinolyse et la mise en route du traitement de prévention secondaire, le développement de traitements neuroprotecteurs, éventuellement utilisables à la phase aiguë de l'infarctus cérébral, reste actuellement conditionné par la nature des lésions à l'échelon cellulaire et moléculaire.

VII.C. Conséquences cérébro-vasculaires de l'ischémie cérébrale

VII.C.1. Conséquences au sein du tissu nerveux

VII.C.1.a Mort neuronale

La conséquence de l'accident vasculaire ischémique est une chute de la pression de perfusion cérébrale. A la phase initiale, le flux sanguin est maintenu normal grâce à la propriété d'autorégulation des artères cérébrales. Lorsque les limites de l'autorégulation sont atteintes, les systèmes de compensation des défaillances des voies d'apport, telles les anastomoses du polygone de Willis, permettent de maintenir un DSC diminué mais suffisant en regard des besoins métaboliques tissulaires. Au stade ischémique, le débit sanguin cérébral est insuffisant pour assurer une oxygénation tissulaire adéquate, ce qui conduit à une cascade d'évènements délétères en terme d'activité électrique et d'homéostasie ionique. Une altération du métabolisme cellulaire apparaît dès que le DSC est inférieur à 22 mL/min/100g de cerveau (Hossmann, 1994). On distingue alors un centre d'ischémie dense au sein duquel le DSC est inférieur à 10 mL/min/100 g (cœur de l'ischémie) et au pourtour une zone de tissu avec un DSC intermédiaire entre 10 et 18 mL/min/100 g (**Figure 40**). Cette zone, désignée sous le terme de pénombre ischémique, correspond à la partie du tissu cérébral ischémié où le débit sanguin est insuffisant pour maintenir un fonctionnement cellulaire normal, mais où la survie cellulaire est cependant assurée dans un premier temps (Baron, 1999). L'électroencéphalogramme (EEG) et les potentiels évoqués corticaux révèlent un silence électrique complet, plus ou moins réversible à condition que le flux artériel soit rétabli (Hossmann, 1994).



(Mehta *et coll*, 2007)

Figure 40: Organisation des lésions cérébrales au décours du processus d'ischémie reperfusion cérébrale

La mort cellulaire survient lorsque le DSC est maintenu plus de trois minutes à moins de 10 mL/min/100 g de cerveau (Baron, 1999). Le cœur de l'ischémie est alors le siège d'une nécrose tissulaire. Cette forme particulière de mort cellulaire, aux caractéristiques anatomiques spécifiques (gonflement des organites intracellulaires et du cytoplasme, lyse osmotique, extrusion du contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire) (Majno et Joris, 1995), se développe rapidement au décours de l'ischémie et met en jeu des processus cytoplasmiques parmi lesquels il convient de citer l'excitotoxicité médiée par le calcium et le glutamate ainsi que les phénomènes de dépolarisation péri-infarctus (Kristian et Siesjo, 1998). Au sein de la zone dite de pénombre, la mort cellulaire résulte principalement d'un processus d'apoptose ou mort cellulaire programmée. Ce type de mort cellulaire se différencie de la nécrose par ses aspects fonctionnels organisés (phase d'initiation, de décision, de dégradation et de phagocytose) et par ses aspects anatomiques (modification des membranes, réorganisation du cytosquelette, condensation de la chromatine, fragmentation de l'ADN et formation des corps apoptotiques) (Charriaut-Marlangue *et coll*, 1996). Cette mort cellulaire programmée résulte d'un déséquilibre entre les nombreux gènes codant pour des protéines pro- et anti-apoptotiques, induit dans des conditions pathologiques telles que l'ischémie cérébrale (Graham et Chen, 2001). La pénombre ischémique représente une zone intacte dans la structure mais altérée d'un point de vue fonctionnel. Elle constitue une cible thérapeutique majeure dans la mesure où les dommages subis sont réversibles à la condition de la restauration d'un métabolisme physiologique assuré notamment par la mise en place d'une reperfusion précoce. Sa sauvegarde est ainsi associée à une amélioration et une récupération neurologique significative au décours de l'accident ischémique (Donnan *et coll*, 2008).

Enfin, l'excitotoxicité, le déficit énergétique et l'accroissement des concentrations intra-cytoplasmiques en calcium vont contribuer à la mise en jeu de nombreux processus

délétères tels que la production de substances oxydantes et l'activation des voies de l'inflammation dont les effets différés dans le temps contribuent à majorer les lésions tissulaires cérébrales (Chan, 2001; Neumar, 2000). Ces phénomènes seront largement favorisés par la reperfusion (Hallenbeck et Dutka, 1990).

VII.C.1.b. L'œdème cérébral

Parallèlement à la mort neuronale, s'instaure un œdème, par augmentation de la teneur en eau du tissu cérébral. L'œdème est d'abord cytotoxique (par anoxie tissulaire), puis vasogénique (par rupture de la barrière hémato-encéphalique). Au cours de l'ischémie cérébrale, l'œdème cytotoxique précède l'œdème vasogénique et la rupture de la BHE. Effectivement, l'accumulation d'eau au cours des premières 24 heures résulte d'un déplacement liquidien et électrolytique à travers les membranes cellulaires et non au passage plasmatique à travers la BHE (Betz *et coll*, 1994; Menzies *et coll*, 1993). Appréciable dans un intervalle allant de quatre à vingt-quatre heures selon le modèle expérimental utilisé, l'œdème atteint son développement maximum au cours du quatrième jour, puis régresse au cours de la deuxième semaine. L'effet de masse est d'autant plus important que l'infarctus est volumineux.

La plupart des voies biologiques qui mènent à l'œdème interviennent dans les processus intervenant suite à l'ischémie : libération excessive de glutamate, stress oxydant, cascade inflammatoire (Gasche et Copin, 2003). De plus, l'augmentation du volume cérébral engendre une augmentation de la pression intracrânienne et une diminution de la perfusion cérébrale, qui amplifie le phénomène ischémique. Enfin, l'œdème cytotoxique, comme l'œdème vasogénique, peuvent être aggravés par la reperfusion, en raison de l'exacerbation du stress oxydant et de la réponse inflammatoire mais également du dysfonctionnement de la BHE.

VII.C.2. Conséquences vasculaires

VII.C.2.a La dysfonction endothéliale

Sur les modèles expérimentaux, les études de la réactivité vasculaire et particulièrement des artères cérébrales ont permis de mettre en évidence de façon consécutive à une ischémie cérébrale, l'altération de la relaxation endothéliale induite par l'acétylcholine (Cipolla et Osol, 1998). Bien que la dysfonction aiguë apparaisse comme la conséquence de lésions structurales des cellules endothéliales, la perturbation de la régulation du NO contribue à des modifications de nombreuses fonctions physiologiques essentielles telles que

la perméabilité, la croissance du muscle lisse, la coagulation, les fonctions plaquettaires ou encore la réponse inflammatoire.

Une importante partie de l'étude des mécanismes de la dysfonction endothéliale s'est attachée à évaluer les mécanismes de la baisse de la biodisponibilité du NO effective suite à l'ischémie cérébrale, résultant d'un équilibre dynamique entre sa production, et son inactivation ou de sa dégradation. Toutefois, la transduction du signal portée par le NO en aval de sa production, ne semble pas être altérée comme en témoigne l'absence de modification de la sensibilité du muscle lisse vis-à-vis d'un donneur de NO tel que le nitroprusside de sodium (SNP), observée dans les études de réactivité vasculaire (Petrault et coll, 2004). Dans le même sens, le dysfonctionnement de la réponse endothéliale à l'ACh ne peut s'expliquer par une altération constitutive de la NOS3 puisque son expression est augmentée au décours du processus d'ischémie-reperfusion cérébrale (Leker et coll, 2001).

La NOS2 est comme nous l'avons vu inductible par des stimuli variés le plus souvent d'origine pathologique représentés par des médiateurs pro-inflammatoires. L'expression de son ARNm est ainsi augmentée tant dans le cœur de l'ischémie que dans la zone de pénombre dans une période initiale de 8 heures au décours du processus d'ischémie reperfusion cérébrale. Un pic d'expression, sous-tendant l'augmentation de son activité, est effectif de 14 heures à 24 heures post-ischémiques avant de s'estomper à 48 heures de reperfusion (Galea *et coll*, 1998). Une fois activée, elle génère selon le même schéma de synthèse du NO que les autres NO synthases une grande quantité de NO sur des périodes prolongées (jusqu'à déplétion des substrats) participant ainsi à la mise en place des conséquences délétères observées en condition inflammatoire au sein du système nerveux (Hickey *et coll*, 2001). Cette surproduction de NO présente au sein du système nerveux une dualité d'effets aussi bien neuroprotecteurs que neurotoxiques. Effectivement, le NO à faible concentration joue le rôle connu de vasodilatateur et de neurotransmetteur. En revanche, à forte concentration retrouvée en conditions d'ischémie reperfusion, sa surproduction est liée aux mécanismes neuroinflammatoires et de mort cellulaire impliquant l'infiltration des cellules mononucléés périphériques ainsi que la surproduction de cytokines pro-inflammatoires (Satake *et coll*, 2000).

Les voies de dégradation du NO pourraient être largement augmentées surtout au moment de la reperfusion. Des données cliniques et expérimentales suggèrent en effet que la dysfonction endothéliale mène à une diminution de la biodisponibilité du NO ainsi qu'à l'augmentation du stress oxydant, qui peut dans ce dernier cas affecter directement la composante endothéliale. Cette diminution de la biodisponibilité du NO peut être causée par

différents mécanismes tels que la perte de substrat ou de co-facteurs de la NOS3, d'une modulation négative de son activité et d'une augmentation de la dégradation du NO par les radicaux libres oxygénés, tels que l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et les dérivés oxygénés non radicalaires (Cai et Harrison, 2000; Rush et coll, 2005).

VII.C.2.b. La dégradation de la matrice extracellulaire et l'ouverture de la barrière hématoencéphalique

La lame basale, constituant spécialisé de la matrice extracellulaire, assure la fonction de contention du sang dans le compartiment vasculaire et connecte les cellules du compartiment endothélial aux couches de cellules sous jacentes. Une perte de cette fonction se traduit par des phénomènes de dilatation (anévrismes) ou de rupture révélés (dissections artérielles, rupture de plaque, rupture vasculaire), en période post-ischémiques par des complications de type hémorragique. Surtout, l'adhésion à la matrice est une condition nécessaire à la survie des myocytes vasculaires et des cellules endothéliales. Sur un modèle d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne, l'altération de la lame basale est observée dès les premières minutes de la reperfusion (Yepes et coll, 2000).

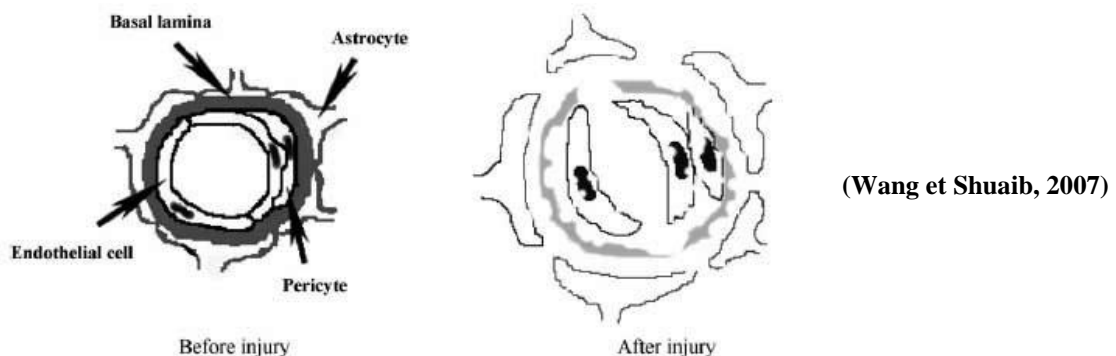


Figure 41: Dégradation des constituants de la matrice extracellulaire au cours de l'ischémie reperfusion

Deux systèmes majeurs de dégradation des protéines de la matrice extracellulaire permettent sa destruction préalablement à son renouvellement ou son remodelage : le système spécifique de dégradation de la matrice, en particulier représenté par les MMPs (*matrix metalloproteinases*), et le système fibrinolytique capable d'activer les MMPs et représenté par le plasminogène (plasmine) généré par des activateurs urokinases (u-PA) et tissulaires (t-PA).

Suite au processus d'ischémie reperfusion, la lame basale se trouve alors altérée entraînant le détachement des cellules endothéliales et des prolongements astrocytaires et donc l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (**Figure 41**). Lorsque l'intégrité de la BHE est perdue, le liquide et les protéines plasmatiques ainsi que les cellules inflammatoires pénètrent le tissu cérébral et provoquent non seulement un œdème (d'abord cytotoxique, puis vasogénique par fuite capillaire) qui engendrera la mort neuronale, mais également un risque

de transformation hémorragique du tissu ischémique (Gasche *et coll*, 2003; Wang *et coll*, 2007).

VII.C.2.c. L'angiogénèse

La formation de nouveaux microvaisseaux à partir de vaisseaux existants (angiogénèse) notamment dans la zone de pénombre fait partie des réponses du tissu cérébro-vasculaire aux dommages ischémiques. La formation de bourgeons capillaires au sein du tissu ischémique, a été mise en évidence 7 jours après le traumatisme d'ischémie reperfusion dans un modèle expérimental d'occlusion artérielle chez le chien (Tsutsumi, 1986). Les cellules endothéliales subissant l'apoptose dans cette région pourraient participer à la régulation du mécanisme d'angiogénèse (Krupinski *et coll*, 2003; Segura *et coll*, 2002) induisant le développement de collatérales artériolaires ainsi que de nouveaux capillaires permettant la restauration d'une perfusion bénéfique en périphérie de la région ischémisée (Gu *et coll*, 2001; Wei *et coll*, 2001). L'angiogénèse se met en place rapidement et les changements de la matrice des microvaisseaux, la génération de protéases, l'apparition de signaux inflammatoires vasculaires représente les éléments nécessaires de l'initiation de l'angiogénèse. La formation d'une nouvelle circulation repose sur une multitude de processus coordonnés de prolifération et de recrutement des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. Ces fonctions sont contrôlées localement par l'action de différents facteurs de croissance (notamment VEGF et BDNF), de protéines d'adhésion (intégrines) et de protéinases qui permettent dans un premier temps l'organisation d'une structure primaire formée de cellules endothéliales puis d'un recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses pour constituer la vascularisation cérébrale finale (Carmeliet, 2000; Kermani et Hempstead, 2007; Sun *et coll*, 2003).

VII.C.2.d. Le découplage entre le débit sanguin cérébral et le métabolisme du tissu neuro-gliale

Sur le plan fonctionnel, le mécanisme protecteur que constitue l'autorégulation est altéré après une ischémie reperfusion. En effet, la reperfusion semble être l'étape délétère à l'origine de la perte du tonus myogénique et celle-ci étant majorée d'autant plus que la durée de la reperfusion est longue (Cipolla et Curry, 2002). De plus, dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat, le muscle lisse développe une altération de la relaxation induite par l'application de KCl (Marrelli et coll, 1998). La réponse du muscle lisse aux variations de concentration de potassium extracellulaire, est une des voies principales assurant rapidement le couplage entre le DSC et l'activité neuronale. Les études électrophysiologiques ont par ailleurs permis de montrer que l'ischémie reperfusion modifie le fonctionnement des canaux

potassiques membranaires Kir2.x, la phase de reperfusion étant celle à l'origine de cette altération (Petrault *et coll*, 2004). L'altération fonctionnelle de ces canaux étant d'autant plus importante que les lésions du tissu cérébral sont sévères en terme de volume d'infarctus et d'œdème (Bastide *et coll*, 1999; Bastide *et coll*, 2007).

VII.D. Mécanismes cellulaires lésionnels

Les lésions du tissu cérébral et vasculaire consécutives à l'ischémie sont la résultante de nombreux mécanismes intriqués et évolutifs dans le temps et dans leur localisation. On assiste ainsi à un phénomène de maturation de l'ischémie, avec très rapidement après la baisse du débit sanguin cérébral, des mécanismes d'excitotoxicité et de dépolarisation péri-infarctus qui endommagent irréversiblement les neurones et les cellules gliales au sein du cœur ischémique. Dans la zone de pénombre avoisinante, d'autres mécanismes se mettent en place, sous la forme d'un stress oxydant, puis plus tardivement de processus inflammatoires et apoptotiques (**Figure 42**).

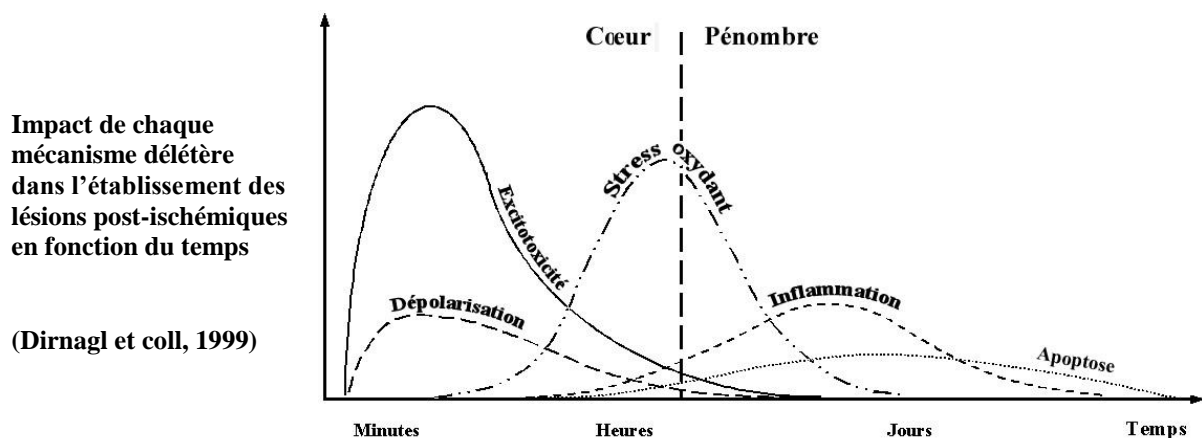


Figure 42: Evolution des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'ischémie cérébrale

VII.D.1. Mécanismes délétères précoces

VII.D.1.a. L'excitotoxicité

L'événement majeur intervenant dans les premiers moments de l'ischémie sur le tissu neuro-glial est la déplétion énergétique en glucose et oxygène. Ces déficits induisent une diminution voire un arrêt de la synthèse d'ATP conduisant à une chute de sa concentration intracellulaire et donc à une diminution de l'activité des transporteurs membranaires ATP dépendants tels que les Ca^{2+} ATPases et les $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPases assurant parmi d'autres systèmes le maintien des gradients ioniques en conditions normales (Rossi et coll, 2007).

Consécutivement à cette déplétion énergétique, l'homéostasie calcique est perturbée conduisant à une augmentation massive du Ca^{2+} dans la cellule qui va initier une cascade d'événements délétères pour le tissu neuro-glial parmi lesquels un dysfonctionnement

des mitochondries (déficit énergétique et synthèse de radicaux libres toxiques), la mise en jeu de systèmes enzymatiques capables de dégrader différentes structures de la cellule (lipases, endonucléases et protéases) ou encore l'activation de la synthèse de NO par l'isoforme neuronale de la NO synthase.

Cette augmentation du Ca^{2+} intracellulaire est majorée secondairement, après l'activation des canaux calciques voltage-dépendants ainsi que par la perturbation des canaux et des pompes ioniques, par la libération de glutamate dans l'espace extracellulaire (Lee et coll, 2000). La présence d'une forte concentration de glutamate au niveau extracellulaire est par ailleurs favorisée par une altération des mécanismes actifs de recapture pré-synaptique (Dirnagl *et coll*, 1999). Au sein de l'espace synaptique, le glutamate va contribuer à l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} et Na^+ par l'activation des récepteurs canaux NMDA (N-méthyle-D-aspartate) et AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxasol propionate) perméables aux cations divalents, et des récepteurs kaïnates/quisqualate (K/Q) perméables aux cations monovalents. Cette entrée massive de cations conduit à une dépolarisation membranaire se transmettant aux neurones excitateurs qui relarguent les ions K^+ afin de repolariser leur membrane. De plus, il semble que certains récepteurs K/Q soient couplés avec des systèmes de seconds messagers tels que le DAG qui par l'intermédiaire de la PKC, participe à l'aggravation des lésions en terme de neurotransmission et d'excitabilité neuronale (Stone et Addae, 2002).

VII.D.1.b. Dépolarisation péri-infarctus et oedème

La dépolarisation peri-infarctus correspond à la propagation dans le tissu cérébral de ces dépolarisations membranaires, qui s'entretiennent de proche en proche, et semblent pouvoir se répéter plusieurs fois par heure et ce de manière prolongée. Cet effet délétère sur le parenchyme cérébral est de surcroît corrélé à l'importance des lésions cérébrales (Dirnagl *et coll*, 1999; Mies *et coll*, 1993). D'autre part, l'entrée massive d'ions Na^+ dans la cellule va être associée à un afflux de molécules d'eau, responsables de l'œdème cellulaire cytotoxique (Ayata et Ropper, 2002).

VII.D.1.c. Le stress oxydant

Le stress oxydant est représenté par l'ensemble des réactions faisant intervenir des espèces réactives de l'oxygène elles mêmes caractérisées par la présence d'un électron célibataire très réactif. Les principales espèces radicalaires dérivées de l'oxygène sont dans le cerveau : l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\circ-}$, le radical hydroxyle $^{\circ}\text{OH}$ qui est de loin l'espèce dérivée de l'oxygène la plus réactive, et bien qu'ils ne soient pas radicalaires mais très réactifs et producteurs de radicaux, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le monoxyde d'azote NO.

(i) Les systèmes de défense antioxydants du cerveau

Face à la production physiologique des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène, l'organisme dispose de systèmes de protection permettant de maintenir les radicaux libres à faible concentration. Ces systèmes sont de deux types : enzymatique et non enzymatique.

Les superoxydes dismutases (SOD) constituent la première ligne de protection enzymatique contre l'anion superoxyde. Elles catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, empêchant ainsi la coexistence de ces deux dérivés oxygénés et par conséquent la génération du radical hydroxyle par la réaction d'Haber-Weiss. Il existe trois types de SOD ayant une localisation différente : la SOD à cuivre/zinc (Cu/Zn-SOD) intracytoplasmique, la SOD conjuguée avec le manganèse (Mn-SOD) localisée dans les mitochondries et la SOD extracellulaire (E-SOD ou SOD 3) intégrée dans les lipides de l'espace extracellulaire ainsi qu'à la surface externe des cellules endothéliales. Les catalases, exclusivement localisées dans les peroxysomes, sont des enzymes qui permettent de transformer le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau. Enfin, les glutathion peroxydases, qui éliminent le peroxyde d'hydrogène en eau, sont des enzymes à sélénium localisées à 90% dans le cytoplasme et 10% dans les mitochondries.

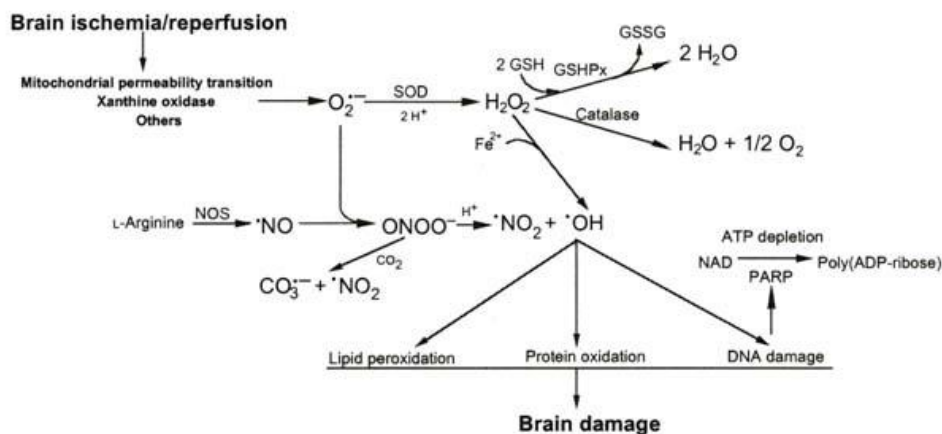
La vitamine C, ou acide ascorbique, est généralement considérée comme le système non enzymatique antioxydant hydrosoluble le plus efficace dans le plasma humain. Elle est en effet capable de céder un électron à pratiquement tous les radicaux libres. Ensuite, la vitamine E (α -tocophérol), est un puissant antioxydant notamment du fait de son caractère lipophile qui lui permet d'agir au site même de la peroxydation lipidique membranaire. Enfin, le glutathion (GSH) et les chélateurs de métaux de transition tels que le fer et le cuivre peuvent agir comme des antioxydants.

(ii) Cibles des radicaux libres, action sur les canaux ioniques

Les désordres métaboliques engendrés par l'ischémie reperfusion cérébrale se trouvent amplifiés lors du rétablissement brutal de la circulation sanguine au cours de l'étape de reperfusion. Il se produit alors une majoration des processus délétères générés par le stress oxydant qui déséquilibre la balance établie entre la production radicalaire et les défenses antioxydantes (Hallenbeck *et coll*, 1990). Bien qu'il a été montré que l'expression de certaines enzymes antioxydantes puisse survenir suite au processus ischémique, des travaux ont rapporté que les systèmes de défense tels que les Cu/Zn SOD, la Mn SOD et la glutathion peroxydase étaient diminués, conduisant à une augmentation finale de la concentration en anion superoxyde et en peroxyde d'hydrogène (Fukui *et coll*, 2002).

Les conséquences moléculaires du stress oxydant sont nombreuses et les effets des radicaux libres oxygénés peuvent être regroupés selon le substrat oxydé : les lipides, les protéines et l'ADN (**Figure 43**).

Les interactions des radicaux libres avec l'ADN sont complexes. L'oxydation des bases azotées conduit à un réarrangement électronique entre les bases de l'ADN (responsable de cassure des brins, d'apparition de sites abasiques et de la dégradation des désoxyriboses de l'ADN) modifiant par conséquent l'expression des gènes avec des répercussions physiologiques très variables.



D'après (Warner et coll, 2004)

Figure 43: Radicaux libres et leurs conséquences délétères

L'action des radicaux libres sur les propriétés membranaires constitue la première étape délétère du stress oxydant. Les effets peuvent survenir suite à leur action directe ou indirecte sur des cibles membranaires variées tels que les canaux ioniques exprimés : les canaux calciques intervenant dans le couplage excitation contraction de la cellule musculaire, les canaux sodiques, potassiques, chlorures ainsi que les échangeurs ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) et les pompes ioniques ($\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$, pompes à H^+ ...) (Kourie, 1998). Les cellules endothéliales ainsi que les myocytes vasculaires sont ainsi autant affectés par les conséquences du stress oxydant lors de l'étape de reperfusion (Brzezinska *et coll*, 2005).

L'action directe des différents radicaux libres sur les canaux ioniques semble notamment provoquer l'oxydation de groupes thiols (-SH) présents au niveau de la chaîne protéique formant le canal ionique. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène peut traverser la bicouche lipidique et être converti en radical hydroxyle par la réaction de Fenton, avec pour conséquence l'oxydation des groupes thiols de sites protéiques se trouvant du côté cytoplasmique. Cette oxydation mène à la formation de liaisons intermoléculaires soit au sein de la même sous unité soit entre différentes sous unités provoquant un changement dans la

structure du canal, modifiant potentiellement ses propriétés spécifiques de transport des ions à travers la bicouche lipidique (activation, inactivation...) et d'autre part ses influences régulatrices permises normalement par l'interaction avec les sous unités auxiliaires. Au niveau des artères cérébrales, seuls les effets sur les canaux $BKCa^{2+}$ et K_{ATP} ont été étudiés avec des conséquences différentes. Les canaux $BKCa^{2+}$ sont activés par le peroxyde d'azote formé par la combinaison de l'anion superoxyde avec le NO (Brzezinska *et coll*, 2000). Les K_{ATP} sont quant à eux inhibés par l'anion superoxyde mais activés par le peroxyde d'hydrogène, ce qui conduit à une vasodilatation par l'action directe sur la protéine mais aussi par la diminution de l'activité de glycolyse et de la phosphorylation oxydative diminuant la concentration intracellulaire en ATP (Liu et Gutterman, 2002).

Comme dans ce dernier cas, la modulation du niveau de phosphorylation des canaux ioniques suite aux effets des radicaux libres constituent leur principale action indirecte (Terashvili *et coll*, 2006). L'altération de la voie PKC passant ou non indirectement par le diacylglycérol (DAG), ou la modulation de l'activité des tyrosines kinases sont des exemples menant aux changements de l'activité des canaux ioniques par le stress oxydant (Shipston et Armstrong, 1996).

En plus de l'action des radicaux libres sur les canaux ioniques, la peroxydation lipidique modifie la structure moléculaire des phospholipides par une oxydation initiée par un radical, oxygéné ou non, qui se propage par la suite de la réaction. Elle perturbe par conséquent l'intégrité membranaire et notamment la fluidité des membranes, participant entre autre à la dérégulation des protéines canalaire qui y sont exprimées (Kourie, 1998).

Les radicaux libres peuvent aussi agir sur l'homéostasie calcique qui module comme nous l'avons vu l'état de contraction du myocyte vasculaire par leur action sur les différents acteurs cellulaires réglant la concentration calcique intracellulaire : Ca^{2+} ATPase de la membrane sarcolemmique et du réticulum sarcoplasmique, échangeur Na^+/Ca^{2+} , modifications des propriétés d'activation et d'inactivation des différents canaux calciques (Kourie, 1998). Cependant, la conséquence finale menant à une vasoconstriction ou vasodilatation est différente selon le niveau de la circulation cérébrale concerné ainsi que de la nature du radical libre (H_2O_2 , $O_2^{\circ-}$, et $^{\circ}OH$) incriminé. Cette diversité de réponse en fonction du radical libre impliqué sur l'ensemble des transporteurs ioniques décrits pourrait constituer un mécanisme assurant une régulation du potentiel de membrane dans les conditions physiopathologiques correspondant à une exacerbation du stress oxydant.

VII.D.2 Mécanismes délétères retardés

VII.D.2.a. Inflammation post-ischémique

L'élévation du calcium intracellulaire, la production de radicaux libres et l'hypoxie permettent la synthèse de facteurs de transcription pro-inflammatoires comme le facteur nucléaire NF- κ B, le facteur induit par l'hypoxie HIF-1 (Ruscher et coll, 1998), le facteur régulateur des interférons IRF-1 (Iadecola et coll, 1999) et le facteur de transcription STAT-3. L'activation de ces facteurs de transcription permet l'expression de nombreux médiateurs de l'inflammation tels que le facteur d'activation plaquettaire (PAF) ou les cytokines TNF- α et IL₁- β (Zhang et coll, 1998). Ces médiateurs vont dans un deuxième temps permettre l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium, en particulier de ICAM-1, VCAM-1, des P-sélectines et E-sélectines (Frijns et Kappelle, 2002). Ces molécules d'adhésion interagissent avec des récepteurs situés à la surface des polynucléaires neutrophiles afin de favoriser leur adhésion à l'endothélium puis leur migration au sein du parenchyme cérébral. Les cellules gliales et les astrocytes participent également à ces processus inflammatoires en particulier au niveau de la zone de pénombre (Stoll et coll, 1998).

L'inflammation post-ischémique peut contribuer aux lésions cérébrales par plusieurs mécanismes. L'obstruction secondaire des micro-vaisseaux par l'activation locale de l'agrégation plaquettaire, de la coagulation et des leucocytes peut majorer les lésions ischémiques (del Zoppo et coll, 1991). De même, la production de médiateurs toxiques par les cellules inflammatoires activées et les neurones environnants est un élément déterminant : induction de la NOS 2 qui participe notamment à la formation de radicaux libres (Iadecola, 1997), expression de la COX 2 impliquée dans la synthèse de radicaux superoxyde et de prostanoïdes cytotoxiques (Nogawa et coll, 1997). Ainsi, les effets cytotoxiques de l'inflammation sur le tissu cérébro-vasculaire reposent essentiellement sur une amplification du stress oxydant accentuant le déséquilibre entre le potentiel oxydant et les défenses antioxydantes et par là même favorisant l'apoptose. Par ailleurs, les mécanismes inflammatoires interviennent dans l'altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique notamment par l'activation des métalloprotéases, favorisant alors l'extension de l'œdème et des lésions tissulaires post-ischémiques (del Zoppo et Mabuchi, 2003).

VII.D.2.b. Apoptose

Comme nous l'avons déjà vu, la nécrose est le mécanisme prédominant à la phase initiale de l'ischémie, alors que l'apoptose apparaît plus tardivement et siège de manière préférentielle au sein de la zone de pénombre. L'initiation de l'apoptose résulte de l'activation

de gènes d'expression immédiate, sous l'influence de l'hypoxie, de la surcharge en calcium, du NO, qui modulent l'expression de nombreuses protéines impliquées dans le développement de l'apoptose (Graham *et coll*, 2001). On distingue ainsi des protéines dont l'expression va favoriser le développement de l'apoptose (protéines pro-apoptotiques : Bax, Bid...) et des protéines qui au contraire limitent le développement de ce type de mort cellulaire (protéines anti-apoptotiques : Bcl-2, Bcl-X_L...).

La phase effectrice de l'apoptose est en partie modulée au niveau des mitochondries et met en jeu deux voies différentes, l'une faisant intervenir les caspases (protéases) et les DNases caspases-dépendantes, et l'autre, directe, faisant appel au facteur inducteur de l'apoptose. L'activation de la voie indirecte des caspases nécessite la libération de cytochrome C par les mitochondries et l'activation du complexe pro-apoptotique, qui associe un facteur activateur de l'apoptose (APAF-1) et la pro-caspase 9. Ce complexe permet l'activation successive des différents effecteurs pour aboutir à la phase finale de l'apoptose par activation de la caspase 3 et d'une DNase caspase-dépendante amenant au clivage de l'ADN nucléaire en fragments de petite taille correspondant aux nucléosomes (Sims et Anderson, 2002). L'autre voie, plus directe, met en jeu le facteur inducteur de l'apoptose (AIF) libéré par la mitochondrie et capable d'induire une fragmentation de l'ADN nucléaire indépendamment de l'intervention de toute autre DNase. Toutefois, les événements conduisant à l'apoptose sont probablement plus complexes et des travaux récents ont apporté des arguments en faveur d'une activation très précoce de l'apoptose au cœur de l'ischémie par des voies indépendantes de la mitochondrie et de la caspase 9 (Benchoua et coll, 2001).

VII.E. Conséquences fonctionnelles de l'ischémie cérébrale

VII.E.1. Syndrome de focalisation

L'accident vasculaire cérébral se manifeste le plus souvent d'une manière brutale (les signes apparaissent en quelques secondes, minutes ou heures), instantanée ou progressive avec une inconstante altération de la conscience. Les signes cliniques peuvent évoluer vers la stabilisation ou la régression. Selon le territoire vasculaire impliqué, les répercussions de l'AVC ischémique affectent des régions précises du cerveau pour lesquelles les symptômes et les déficits neurologiques sont plus ou moins sévères et installent un handicap particulier, c'est le syndrome de focalisation.

Le pronostic immédiat (vital) et ultérieur (fonctionnel) dépendent, pour beaucoup, de la rapidité de prise en charge clinique et d'un accès à l'imagerie cérébrale. Le scanner permet notamment lorsqu'il est réalisé en urgence, de différencier les AVC ischémiques et

hémorragiques, de préciser le siège, l'étendue et le retentissement de la lésion cérébrale. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est parfois utilisée pour certaines localisations anatomiques particulières (tronc cérébral). D'autres examens peuvent préciser le mécanisme de l'AVC notamment, les explorations artérielles par des méthodes non-invasives (doppler et écho-doppler pulsé), angiographiques, indispensables si l'on suspecte une malformation vasculaire et permet parfois son traitement grâce aux techniques d'embolisation (par la sonde utilisée), et les examens cardiaques qui recherchent une cardiopathie emboligène et une hypertension artérielle.

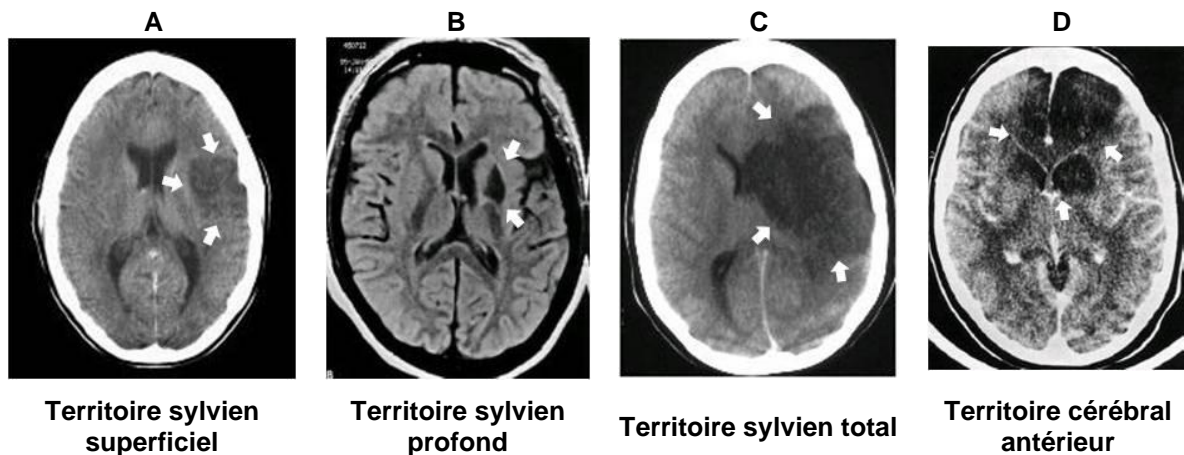
Comme nous l'avons vu, les deux voies d'apport sanguin cérébral sont représentées par les systèmes carotidien et vertébro-basilaire, deux origines nous permettant d'une part de distinguer les accidents ischémiques affectant le territoire carotidien et d'autre part ceux affectant le territoire vertébro-basilaire.

VII.E.1.a. Les accidents ischémiques du territoire carotidien

Ils représentent 80% des infarctus hémisphériques et concernent le plus fréquemment l'artère cérébrale moyenne (territoire sylvien) suivis de ceux impliquant l'artère cérébrale antérieure. Leur symptomatologie controlatérale est caractérisée principalement lorsque l'atteinte affecte l'artère sylvienne gauche par une hémiparésie à prédominance brachio-faciale, des troubles sensitifs du territoire paralysé ; une hémianopsie latérale homonyme (perte droite ou gauche de la moitié du champ visuel), une aphasie ainsi qu'une apraxie constructive et gestuelle. Celle concernant l'artère sylvienne droite induit plus particulièrement une négligence gauche, une anosognosie ainsi qu'une apraxie constructive et de l'habillage.

L'atteinte du territoire de l'artère sylvienne superficielle provoque en plus des déficits cités précédemment mais exprimés à des degrés divers une hémiparésie prédominante à la face et au bras (**Figure 44A**). Celle affectant le territoire de l'artère sylvienne profonde induit quant à elle une hémiparésie globale (**Figure 44B**).

L'accident ischémique sylvien total affecte plus sévèrement les grandes fonctions (aphasie globale, hémiparésie massive...) avec fréquemment la présence de troubles de la conscience et une déviation conjuguée de la tête et des yeux vers le côté de la lésion (**Figure 44C**). L'accident ischémique de l'artère cérébrale antérieure installe une hémiparésie avec troubles sensitifs, une apraxie idéomotrice de la main, un syndrome frontal (adynamie) et selon la sévérité peut induire bien que rarement un mutisme akinétique (**Figure 44D**).

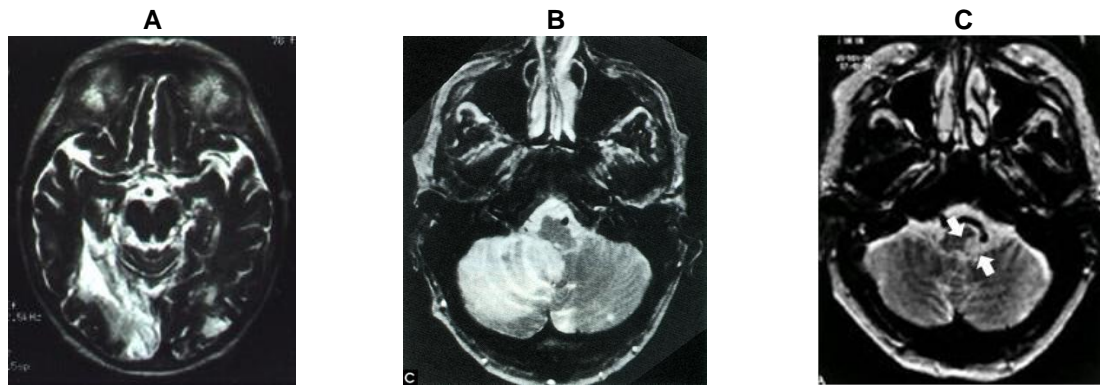


Images IRM

Figure 44: Atteintes des différentes régions cérébrales du territoire carotidien

VII.E.1.b. Les accidents ischémiques du territoire vertébro-basilaire

Les accidents ischémiques du territoire vertébro-basilaire concernent l'atteinte des artères cérébrales postérieures et des artères cérébelleuses. Ceux affectant les artères cérébrales postérieures du territoire superficiel développent une hémianopsie latérale homonyme isolée, parfois associée à une incapacité de lecture, une agnosie visuelle ou encore des troubles de la représentation spatiale. L'atteinte du territoire profond se caractérise par le syndrome thalamique (troubles sensitifs et apparition différée de douleurs intenses. En cas d'infarctus bilatéral, une cécité corticale et des troubles mnésiques apparaissent (syndrome de Korsakoff) (**Figure 45A**). Les accidents localisés au niveau des artères perforantes et cérébelleuses (syndrome de Wallenberg) provoquent une atteinte du tronc cérébral et sont responsables de syndromes alternes selon les nerfs et les régions impliquées. La symptomatologie initiale est illustrée par une sensation de vertige avec des troubles de l'équilibre et des céphalées postérieures. Les infarctus graves du tronc cérébral provoquent des comas pouvant mener au décès ou à une atteinte motrice bilatérale (**Figure 45B et C**).



Territoire cérébral postérieur

Territoire cérébelleux

Territoire du tronc cérébral

Images IRM : les zones d'hypersignal correspondent aux zones lésées.

Figure 45: Atteintes des différentes régions cérébrales du territoire vertébro-basilaire et de l'artère cérébrale postérieure

VII.E.2. Evolution de l'AVC

La mortalité au stade initial est élevée, on estime qu'un malade sur dix meurt le premier jour, un sur trois au cours des six premiers mois et un sur deux au cours de l'année écoulée (Hankey *et coll*, 1998; Hankey *et coll*, 2000). Par la suite, ceux qui ont survécu retrouvent à peu près l'espérance de vie des personnes du même âge. Ces données sont à replacer dans les contextes d'intégration des malades dans le milieu hospitalier. La mortalité peut en effet se trouver surévaluée par le fait que seuls les malades les plus graves sont hospitalisés ou admis dans les unités spécialisées, ou par une durée d'hospitalisation particulièrement longue. A l'inverse, la survenue du décès avant l'admission à l'hôpital des malades les plus graves, ainsi qu'une durée brève d'hospitalisation peuvent expliquer un pourcentage de décès réduit. Le délai AVC-décès varie selon le type d'AVC (la mortalité suite à un AVC hémorragique approche les 50% au cours du premier mois) et la cause finale du décès.

De nombreux facteurs peuvent influencer le pronostic du patient : l'âge, le sexe, la perte de connaissance initiale... Dans tous les cas, la principale cause de mortalité précoce est la destruction cérébrale massive corroborée à l'ensemble des déficits neurologiques engendrés. A cela viennent s'ajouter d'autres affections secondaires consécutives à l'AVC telles que les complications dues à l'immobilité responsables de 35% des décès dont 20 à 30% de pneumopathies et 3 à 15% d'embolies pulmonaires ainsi que la combinaison en général simultanée d'autres pathologies graves de nature cardiaque ou métabolique (Hankey *et coll*, 2000).

Le pronostic à long terme (période supérieure aux six premiers mois) est quant à lui largement influencé par l'impact des déficits neurologiques initial ainsi que l'âge, une forte glycémie, la température corporelle, les récurrences éventuelles d'AVC (dans 25% des cas)

et la survenue d'infarctus du myocarde (Weimar *et coll*, 2002). D'un point de vue fonctionnel, environ 60% des patients gardent des séquelles invalidantes et moins de 20% des survivants retrouvent une activité au niveau antérieur à l'accident cérébral.

Les conséquences psychiatriques doivent être prises en compte dans l'observation de l'évolution des patients touchés. Celle-ci empêche en effet la phase de rééducation et de réadaptation du patient dans le processus de rétablissement en compromettant notamment la qualité de vie et en augmentant la mortalité (Gaete et Bogousslavsky, 2008). La fréquence de la dépression post accident vasculaire cérébral se situe entre 20 et 60% selon les études. Il s'agit d'une affection fréquente qui survient en général précocement et peut perdurer dans le temps. Les troubles de l'expression et de la compréhension verbale rendent impossible l'analyse du vécu dépressif en termes d'affectivité et d'altération de l'image de soi. Une asthénie est fréquemment retrouvée même au-delà du sixième mois et en dehors d'une atteinte motrice ou d'une dépression. L'AVC peut entraîner chez certains patients, surtout âgés, des troubles du sommeil, un sentiment de culpabilité, une perte de concentration. Les populations concernées étant généralement dans leur sixième décennie en moyenne, le diagnostic différentiel avec une démence se pose fréquemment car celle-ci débute progressivement avec le masque d'une dépression dans 10% des cas. Certaines autres modifications de l'humeur ou du comportement peuvent par leur durée être assimilées à des manifestations pseudo-dépressives telles que le rire et les pleurs spasmodiques de durée courte, l'anxiété et le syndrome athymormique (manque d'expressivité des sentiments). Il est apparu très vite que la fréquence de survenue et la sévérité de la dépression sont corrélées avec la localisation cérébrale de la lésion (Folstein *et coll*, 1977). Le traitement testé dans la majorité des cas consiste en l'administration d'antidépresseurs même si leur efficacité sur le long terme reste à démontrer (Gaete *et coll*, 2008).

VII.E.3. La Plasticité cérébrale

La succession des processus physiopathologiques consécutifs à l'accident ischémique engendre rapidement des altérations des réseaux nerveux au sein du tissu cérébral dont l'évolution dans le temps implique des mécanismes de plasticité cérébrale. L'ensemble de ces mécanismes, menant dans le meilleur des cas à une récupération spontanée, est à ce jour encore mal compris. Elle correspond à la capacité du tissu cérébral de s'adapter tant morphologiquement que fonctionnellement et intervient lors du développement de l'individu, dans son apprentissage mais se révèle aussi dans les conditions pathologiques telle que celle de l'ischémie cérébrale (Lledo *et coll*, 2006). Une hiérarchisation en cinq étapes dans le temps

a été proposée suite à l'étude de ces mécanismes en parallèle de l'observation clinique effectuée chez les patients (**Figure 46**) (Kreisel *et coll*, 2006).

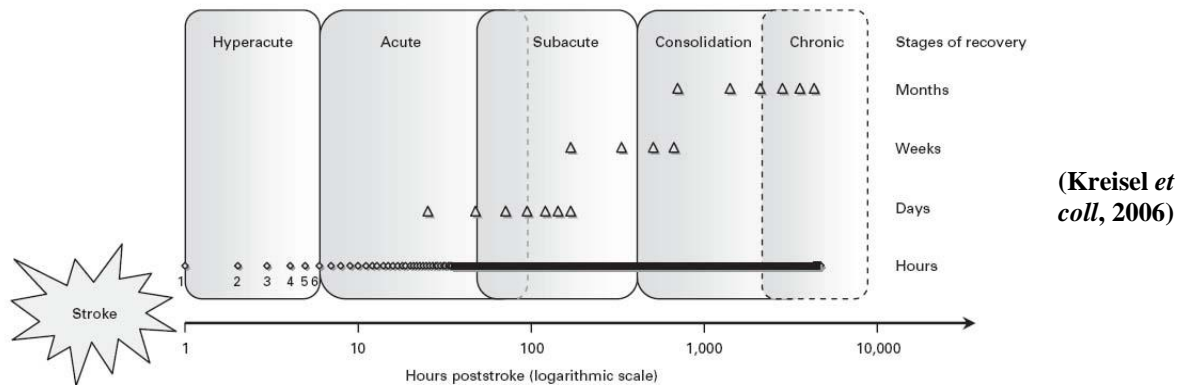
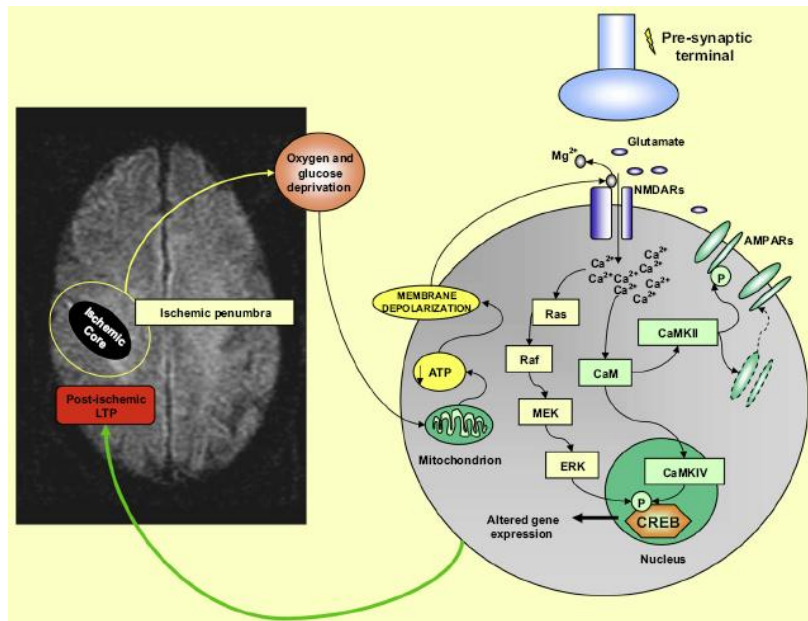


Figure 46: Représentation schématique de la chronologie de la récupération

Suite à l'accident cérébral, une phase appelée "hyper aiguë" où s'établissent les mécanismes délétères précoces de l'ischémie s'étend jusqu'à la sixième heure post-ischémique. Elle correspond aux différents mécanismes délétères cités auparavant menant à la formation du cœur et de la pénombre ischémique. Au sein de celle-ci ainsi que dans la région cérébrale entourant plus largement la zone lésée s'établissent les premiers mécanismes de plasticité consistant en des adaptations de l'excitabilité neuronale ainsi qu'à une activation de l'efficacité de la transmission synaptique aussi appelée la potentialisation à long terme post-ischémique (i-LTP) (Di Filippo *et coll*, 2008). Elle se traduit par une augmentation importante et durable de l'efficacité synaptique (**Figure 47**).



(Di Filippo *et coll*, 2008)

Figure 47: Mécanismes moléculaires de la potentialisation à long terme post-ischémique (i-LTP)

Lorsque la modification d'efficacité est induite après l'activation de la synapse, des mécanismes moléculaires dans les neurones conduisent progressivement à des changements morphologiques durables des réseaux nerveux. Les récepteurs AMPA et NMDA entrent en jeu lorsque l'activité des neurones présynaptiques est élevée par notamment la libération importante de glutamate et une dépolarisation importante de la membrane postsynaptique et que le seuil critique d'activation des neurones postsynaptiques est dépassé. Ces récepteurs s'activent et les ions calcium entrant massivement dans le neurone postsynaptique déclenchent une cascade de réactions moléculaires qui aboutit à une modification durable de la synapse. Il y a alors activation au niveau postsynaptique d'un ensemble de protéines kinases (CamKII...) qui participent à la transmission des signaux dans la cellule par phosphorylation d'autres protéines (récepteurs AMPA et NMDA) qui augmente leur sensibilité ainsi qu'une activation de la machinerie génique. Des messagers sont aussi libérés et agissent sur les neurones présynaptiques en provoquant la modification de l'activité des complexes protéiques qui participent à l'amarrage et à la fusion des vésicules synaptiques, augmentant la libération de neuromédiateurs. De plus, les synapses changent de forme et de taille et les surfaces d'apposition entre les éléments pré-et post-synaptiques augmentent. Des synapses qui étaient jusqu'alors silencieuses deviennent actives et de nouvelles synapses peuvent aussi se former suite à l'accident ischémique.

Des interactions nerveuses et métaboliques entre la zone ischémisée et les zones cérébrales contralatérales s'établissent progressivement et correspondent aux mécanismes de compensation des fonctions perdues (Witte *et coll*, 2000). Ainsi, il est observé suite à

l'ischémie une augmentation générale du débit sanguin cérébral au niveau de l'hémisphère contra-latéral suite aux mouvements effectués par la main normalement contrôlé par la région cérébrale lésée par l'ischémie (Silvestrini *et coll*, 1998).

La phase aiguë, qui s'étend jusqu'au quatrième jour, correspond quant à elle à l'étape où les mécanismes délétères retardés de l'ischémie atteignent leur impact maximal. Cette période se caractérise notamment par l'amplification des mécanismes complémentaires de potentialisation et de dépression à long terme qui jouent alors un rôle majeur dans la mise en place de la plasticité cérébrale. A ce stade s'opère une stimulation de la neurogenèse cérébrale en réponse au traumatisme ischémique qui active des cellules progénitrices localisées notamment dans les régions du gyrus denté et sous ventriculaires. Ces cellules neuronales mais aussi gliales nouvellement formées sont susceptibles de migrer au sein du tissu cérébral vers les régions ischémisées selon des processus de prolifération, de migration et de différenciation parfaitement contrôlés (Wiltrout *et coll*, 2007), augmentant les possibilités de récupération fonctionnelle en phase post-ischémique (Ernst et Christie, 2006).

De manière simultanée à la phase aiguë démarre une phase dite "subaiguë" se caractérisant par l'établissement des lésions retardées dès les premières 48 heures et à la diminution progressive de leur intensité dans les semaines suivantes laissant réellement place aux mécanismes fonctionnels de la plasticité cérébrale. Une étape de "consolidation" se poursuit ensuite pendant plusieurs mois après le début de l'ischémie et correspond à la mise en avant des mécanismes de plasticité cérébrale permettant la récupération spontanée par rapport aux déficits cérébraux subits par le tissu cérébral. Enfin, la période post-ischémique se termine par une phase chronique où l'ensemble des mécanismes mis en jeu s'équilibre.

VII.E.4. La rééducation

Les malades qui ont dépassé la phase aiguë ont tous une récupération spontanée de leur déficit et une amélioration fonctionnelle. Cette récupération varie d'un malade à l'autre dans des proportions importantes, sans qu'il soit possible de la prévoir. La mise en œuvre d'une rééducation précoce et systématique est indispensable à la phase initiale. Elle est constituée de plusieurs phases en fonction de la gravité initiale du handicap du sujet qui présente le plus souvent une paralysie ou une diminution des commandes volontaires. Elle consiste en une remise en fonction progressive des différentes fonctions motrices et sensori-motrices des membres inférieurs puis postérieurs jusqu'à la reprise éventuelle d'une marche autonome. La récupération peut être totale, mais elle est le plus souvent de mauvaise qualité au niveau du membre supérieur avec en particulier une absence de mouvements dissociés des doigts, de la préhension globale et des difficultés d'ouverture de la main. Même si la

récupération est plus importante au niveau du membre inférieur, il peut persister un déficit global majeur, total au membre supérieur, avec au membre inférieur quelques mouvements mais qui ne permettent pas une reprise de la marche. Le retour au domicile est l'aboutissement logique du séjour en rééducation. Un patient sur cinq reste dépendant, réclamant l'aide d'une tierce personne pour la réalisation des activités de la vie quotidienne. Maintenir les performances acquises à la sortie du centre de rééducation nécessite la poursuite journalière de l'entraînement adapté aux conditions de vie quotidienne, même s'il est souvent observé une amélioration des performances. Enfin, une surveillance médicale et une surveillance orthopédique afin d'éviter et de limiter les risques de récurrences doit être réalisée, en parallèle d'un maintien des contacts avec l'extérieur dans le but d'éviter le risque de désocialisation.

VII.F. Cibles pharmacologiques de l'ischémie cérébrale

I.F.1. Traitements préventifs des AVC

Bien que leur incidence et même leur mortalité aient connu une diminution remarquable depuis ces trente dernières années, les accidents vasculaires cérébraux demeurent fréquents et graves en plus de laisser perdurer chez environ 50 % des sujets un handicap physique ou intellectuel. Un élément essentiel de la lutte contre les AVC est la prévention puisqu'une fois l'accident survenu, les ressources thérapeutiques restent malheureusement à l'heure actuelle des plus limitées. La prévention doit avant tout prendre en compte les nombreuses étiologies des AVC qui requièrent chacune une stratégie préventive spécifique dans un but d'anticipation et de réduction des lésions.

La majorité des AVC de type ischémique est liée à l'athérosclérose. Le traitement préventif primaire est donc basé sur le dépistage et le traitement des facteurs de risque liés, représentés essentiellement par l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, le diabète sucré et le tabagisme, pour tenter de prévenir la formation de la plaque d'athérome. Cette démarche est d'autant plus efficace que ces mesures sont mises en œuvre précocement. L'utilisation des traitements anti-thrombotiques (aspirine et antiplaquettaires) est plus efficace en prévention secondaire, c'est-à-dire après un premier accident vasculaire, qu'en prévention primaire et permet de lutter contre les récurrences dues à des processus thrombo-emboliques secondaires. Dans les cas très sévères de sténose ou d'anomalies artérielles particulières, un acte chirurgical peut être pratiqué à titre préventif. Par ailleurs, la prévention d'AVC par embolie d'origine cardiaque repose sur le traitement de la cardiopathie causale et le recours aux

anticoagulants, héparine en prévention à court terme, anticoagulants oraux en prévention au long cours.

I.F.2. Traitement curatif des infarctus cérébraux

Les thérapeutiques curatives efficaces de la phase aiguë restent encore peu nombreuses. Les objectifs de ces traitements sont de tenter de limiter voire d'interrompre la séquence délétère des événements ioniques, biochimiques et moléculaires décrits auparavant comme responsables des lésions cérébrales. Elles font l'objet de nombreuses recherches qui ont augmenté de façon considérable ces dix dernières années. La **Figure 48** représente ainsi les différentes classes d'agents à visée neuroprotectrice testés jusqu'au stade de la phase clinique.

I.F.2.a. Stratégies thérapeutiques visant à limiter l'œdème cérébral

Comme nous l'avons vu, les perturbations biochimiques d'origine ischémique modifient considérablement l'homéostasie tissulaire et sont responsables de la formation d'un œdème cérébral délétère. L'utilisation des glucocorticoïdes telle que la dexaméthasone, très efficaces dans l'œdème tumoral, n'a pas fait la preuve de son efficacité dans le traitement de l'œdème ischémique. Les solutions hyperosmolaires de mannitol (20 %), parfois associées à la dexaméthasone, de glycérol (10 %) et d'urée, ont été proposées afin de retenir l'eau dans le compartiment vasculaire (Toung *et coll*, 2005). Si cette stratégie appliquée à court terme peut réduire le nombre de décès, le bénéfice à moyen et long terme n'a pas été démontré et il se pourrait, qu'en raison de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique, l'effet osmotique de ces substances aggrave l'œdème cérébral par passage des solutions hyperosmolaires dans les tissus lésés. L'utilisation de diurétiques, comme le furosémide ou l'acétazolamide, diminue la production du liquide céphalo-rachidien ainsi que le volume sanguin circulant, limitant probablement la formation de l'œdème cérébral. Mais cette baisse de volume du compartiment extracellulaire aggrave l'hypoperfusion cérébrale en raison de la chute de la pression artérielle.

I.F.2.b. Stratégies thérapeutiques à visée vasculaire et traitement thrombolytique

Bien que leur efficacité n'ait jamais été démontrée de façon absolue dans le traitement de l'infarctus cérébral par occlusion artérielle, les anticoagulants sont surtout utilisés en cas de cardiopathie emboligène. Le but premier de l'utilisation des anticoagulants est de s'opposer aux mécanismes thrombo-emboliques impliqués dans de nombreux cas d'infarctus, en limitant l'extension de la thrombose et en prévenant la récurrence embolique. L'héparine est utilisée durant la phase aiguë et sera éventuellement relayée par les

antivitaminiques K. Toutefois, l'utilisation des anticoagulants n'est pas sans risque et nécessite une surveillance accrue de l'état neurologique du patient, concernant en particulier l'état de vigilance et l'œdème cérébral, en raison de l'apparition éventuelle d'une transformation hémorragique qui se produit dans 15% des cas et impose l'arrêt immédiat du traitement. Dans l'infarctus cérébral constitué, l'anticoagulation n'a aucune efficacité sur la récupération neurologique. En revanche, l'utilisation d'anticoagulant ou d'héparine de bas poids moléculaire à dose préventive peut se justifier afin de prévenir les complications thrombo-emboliques.

Une occlusion artérielle est visible à l'artériographie dans les premières heures dans 75% des cas. Dans ces conditions, la mise en place d'un traitement thrombolytique dans cette courte période est susceptible d'accélérer la recanalisation spontanée de l'artère et donc de restaurer plus rapidement le débit sanguin cérébral. Ce traitement repose sur sa capacité à accélérer et amplifier le mécanisme physiologique de la fibrinolyse (faisant notamment intervenir l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) synthétisé par l'endothélium vasculaire), qui mène à la destruction du caillot à l'origine de l'occlusion artérielle. Actuellement, la molécule la plus prometteuse est le rt-PA ou activateur tissulaire recombinant du plasminogène. Toutefois, administré trois heures après l'infarctus cérébral constitué, les principaux risques de la fibrinolyse sont les complications hémorragiques neurologiques et systémiques auxquels s'ajoute un risque d'œdème cérébral dû à la reperfusion elle-même. Cette courte fenêtre thérapeutique restreint l'usage de la fibrinolyse seulement à une fraction des patients susceptibles de recevoir le traitement d'autant plus que son utilisation requiert des compétences et des conditions centralisées dans des unités de soins spécialisés. Une méta-analyse montre une surmortalité à 3 mois chez les patients traités par fibrinolyse en raison de ces risques (Warlow et Wardlaw, 2003). Ceux-ci étaient d'autant plus élevés que le rt-PA est utilisé au-delà de 6 heures après le début de l'ischémie. L'un des enjeux majeurs pour augmenter l'efficacité du traitement serait donc d'élargir sa fenêtre thérapeutique au delà des trois premières heures tout en limitant le risque hémorragique. Pour autant, bien qu'il ne permette pas de diminuer la mortalité chez la majorité des sujets, ce traitement reste l'un des plus efficaces pour la réduction des troubles observés en phase post-ischémique (Hacke *et coll*, 2004).

D'autres substances comme les vasodilatateurs artériels (papavérine...) ont été envisagés en vue de leur rôle bénéfique théorique dans l'amélioration de la perfusion de la région ischémisée. Toutefois, ce bénéfice est rapidement dépassé par un rôle néfaste puisque

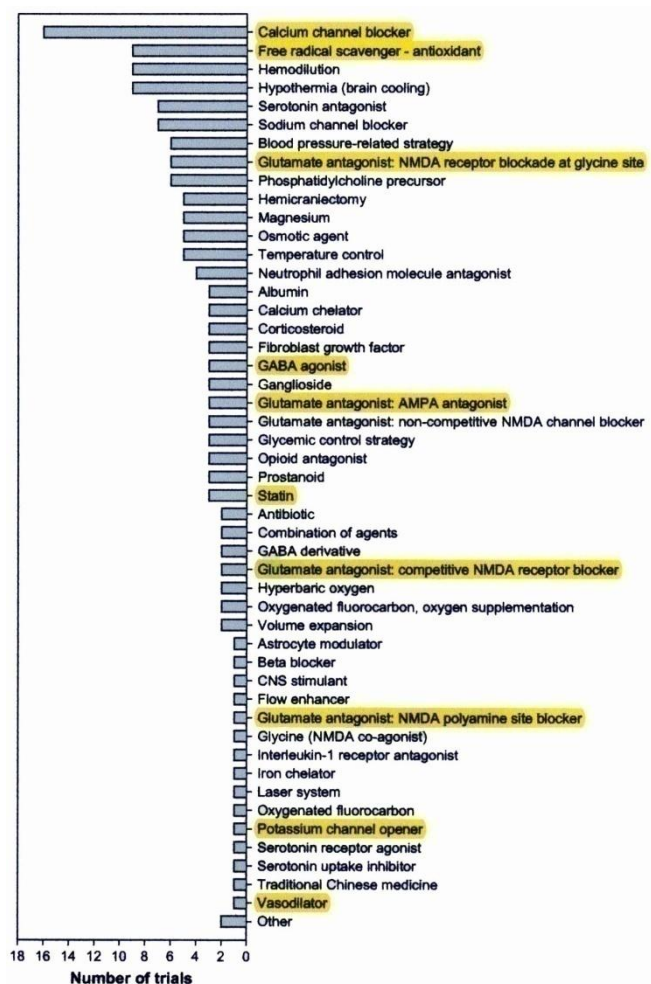
l'augmentation concomitante de la perfusion du parenchyme sain s'effectue au détriment du parenchyme ischémié.

I.F.2.c. Stratégies thérapeutiques induisant une neuroprotection à la phase aiguë

A coté de ces possibilités très restrictives, les essais cliniques concernant les effets des substances anticalciques ont été les plus nombreux au cours de ces dernières années (**Figure 48**). Les bloqueurs des canaux calciques de type L réduisent l'influx calcique neuronal, potentiellement bénéfique vue l'implication délétère de ces canaux dans la formation des lésions neuronales notamment dans les mécanismes d'excitotoxicité. La nimodipine (1,4-dihydropyridine) possède l'avantage d'agir positivement au niveau du compartiment neuronal tout en ayant une faible activité vasodilatatrice. Elle présente une bonne efficacité dans la prévention des infarctus après hémorragie méningée ainsi qu'une diminution de la mortalité toutes causes confondues au cours des quatre premières semaines. Ces résultats ont cependant été contestés en ce sens que l'efficacité de la nimodipine sur l'évolution neurologique du patient, est avérée si et seulement si une forte dose était administrée dans les dix huit premières heures alors que la majorité des essais cliniques étaient réalisés au-delà de cette période. L'évaluation d'autres anticalciques (flunarizine, isradipine) n'a pas permis de démontrer une meilleure efficacité dans ce domaine.

De nombreuses recherches ont aussi été conduites dans le but de développer une neuroprotection en rapport avec l'effet cytotoxique du glutamate, neurotransmetteur exciteur majeur du système nerveux central. Certains arguments sont en faveur de l'existence d'un lien étroit entre la libération excessive de glutamate et la propagation de la mort neuronale en réponse à la dépolarisation neuronale. Des approches électrophysiologiques montrent que les canaux-récepteurs NMDA et AMPA activés par le glutamate et perméables aux cations dont le calcium et le sodium contribuent à l'excitotoxicité par des modifications post-ischémiques de leurs propriétés électriques. Dans ce sens, les modèles expérimentaux ont permis de tester un nombre important de substances appartenant à des classes différentes. Citons les antagonistes non compétitifs (MK801), des antagonistes compétitifs (Selfotel), des antagonistes du site de fixation de la glycine du récepteur NMDA (GV150526), des inhibiteurs de la libération de glutamate (Propentophylline), des antagonistes AMPA (YM872)... En dépit des espoirs initiaux soutenus par des résultats expérimentaux prometteurs, l'ensemble des voies explorées en clinique sont restées infructueuses, la plupart des études s'avérant malheureusement négatives dans les différentes phases des essais cliniques.

En raison de son action opposée à celle du système glutamatergique, le système GABAergique a fait l'objet d'une attention particulière dans les mécanismes de mort neuronale au décours de l'ischémie cérébrale. Des études ont en effet montré que la conductance au chlore des récepteurs GABA était diminuée en réponse aux stimuli induits par l'ischémie. Il est établi par ailleurs que des agonistes GABAergiques favorisent la mise en place d'une neuroprotection dans les modèles expérimentaux. Les principaux agonistes utilisés sont la Clomethiazole, largement utilisée pour ses propriétés sédatives et le diazépam. Les essais cliniques ne rapportent malheureusement aucun effet bénéfique et il semble par ailleurs que la fenêtre thérapeutique d'utilisation relativement courte de ces agonistes constitue une difficulté majeure dans le développement du traitement (Kong *et coll*, 2002; Lodder *et coll*, 2006).



(Ginsberg, 2008)

Figure 48: Essais cliniques neuroprotecteurs à la phase aiguë de l'accident vasculaire cérébral

Une autre stratégie est celle utilisant les agents antioxydants comme traitement neuroprotecteur. Le NXY-059 est une molécule destinée à réduire les altérations provoquées par les radicaux libres générés notamment par le stress oxydant. En expérimentation animale,

sur les différents types d'ischémie cérébrale aiguë, il a donné des résultats intéressants mais qui n'ont pas été confirmés au cours des études cliniques "Stroke-Acute Ischemic NXY Treatment" par les essais SAINT I (Lees *et coll*, 2006) et SAINT II (Shuaib *et coll*, 2007). Sur des modèles d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne chez le rat, le NXY-059 montre ainsi un effet bénéfique dose-dépendant avec une réduction du volume d'infarctus de 77% et des améliorations notables des déficits neurologiques engendrés (Sydserff *et coll*, 2002). Son effet semble bénéficier d'une fenêtre thérapeutique relativement intéressante puisque ses effets persistent même après une administration postérieure à 5 heures du début de l'accident ischémique (Zhao *et coll*, 2001). Cependant, des arguments peuvent expliquer son absence de réelle efficacité en phase clinique par sa faible aptitude à traverser expérimentalement la barrière hémato-encéphalique pendant les premières heures de reperfusion (Kuroda *et coll*, 1999), dont l'évaluation est appuyée pour cela par la mise au point de modèles *in vitro* de barrière hémato-encéphalique (Cecchelli *et coll*, 2007). Une augmentation importante et progressive sur des périodes d'ischémie plus prolongées dans le temps de la perméabilité du NXY-059 pourrait expliquer en partie ses effets neuroprotecteurs dans des modèles d'ischémie permanente, cependant moins représentatifs de la pathologie ischémique rencontrée chez l'homme (Dehouck *et coll*, 2002). Son action antioxydante se révèle de plus être peu efficace contraignant à l'administration néfaste de fortes doses (Ginsberg, 2008).

Trois autres molécules antioxydantes ont été testées. Le tirilazad mesylate (U-74006F), inhibiteur de la peroxydation lipidique, avait montré des résultats prometteurs en phase expérimentale dans les années 1980. Cependant, les essais cliniques ne montraient aucun effet sur le volume d'infarctus chez l'homme en plus d'un problème lié à l'utilisation d'un dosage inadéquat (van der Worp *et coll*, 2005). L'ebesen qui possède une activité semblable à celle de la glutathion peroxydase, montre un effet potentiel s'il est administré dans les 24 heures post ischémiques et s'intègre à ce jour dans un essai clinique de stade 3. Enfin, l'edaravone (MCI-186) agit en tant que piègeur des radicaux oxygénés et a montré des effets bénéfiques dans un essai clinique de stade 2, montrant une amélioration fonctionnelle à 3 mois (Higashi *et coll*, 2006).

En parallèle de ces essais cliniques, des études expérimentales sont menées démontrant les effets vasculoprotecteurs de molécules testées dans la recherche de stratégies neuroprotectrices consécutives à l'AVC ou dans celles relatives aux différents facteurs de risques telle l'hypertension artérielle. Les polyphénols végétaux présents notamment dans la peau et les graines du raisin rouge, des mûres ainsi que dans les arachides possèdent des

propriétés biologiques antioxydantes et anti-inflammatoires et agissent positivement sur les pathologies liées à l'athérosclérose et à l'infarctus du myocarde (Lu *et coll*, 2006). De nombreuses études menées sur des modèles expérimentaux d'ischémie reperfusion cérébrale concernant les effets de ces composés, dont notamment le resvératrol, indiquent qu'ils induisent une neuroprotection ainsi qu'une stimulation du processus d'angiogénèse, effets bénéfiques retrouvés en parallèle au niveau comportemental et sur les marqueurs du stress oxydant (Dong *et coll*, 2008; Sinha *et coll*, 2002). Des effets vasculoprotecteurs sont aussi retrouvés expérimentalement, par l'administration d'extraits de polyphénols de vin rouge en traitement chronique chez des rats spontanément hypertendus (SHR) ou par l'application locale au niveau des artérioles cérébrales étudiées *in vivo*. Ils améliorent en effet sur ces modèles les fonctions vasculaires de relaxation dépendante de l'endothélium ainsi que les propriétés mécaniques (diamètre artériolaire et stress mécanique) et actives du vaisseau cérébral (Chan *et coll*, 2008; Chan *et coll*, 2008).

(i) Résistance à l'ischémie et neuroprotection préventive

Devant l'absence de stratégies thérapeutiques actuelles satisfaisantes, la mise au point de nouveaux agents thérapeutiques dans le domaine de l'ischémie cérébrale a nécessité de faire évoluer la notion de neuroprotection. La possibilité d'induire un état de résistance à l'ischémie cérébrale par l'administration d'agents pharmacologiques avant la survenue de l'infarctus semble ainsi promettre de significatives avancées. La résistance à l'ischémie peut se définir comme la situation au cours de laquelle les conséquences, en terme de taille d'infarctus, deviennent moins importantes qu'à l'état normal (Murry *et coll*, 1986). Ce mécanisme, d'abord mis en évidence sur le myocarde, fut l'objet de travaux au sein du laboratoire par la mise en évidence de l'induction d'une résistance à l'ischémie cérébrale par préconditionnement et par administration de faibles doses d'endotoxine bactérienne (lipopolysaccharide bactérien ou LPS) dans un modèle d'ischémie reperfusion cérébrale focale (Bordet *et coll*, 2000). Parmi les mécanismes mis en jeu dans cet état de résistance, ces travaux ont permis de discuter la place respective de la modulation du stress oxydant et des enzymes antioxydantes, de l'induction de la voie du NO, en particulier de la NOS endothéliale, ainsi que celle de la modulation des voies de l'inflammation via la diminution de l'expression des protéines d'adhésion vasculaires (Bastide *et coll*, 2003; Bordet *et coll*, 2000; Deplanque *et coll*, 2003; Pu *et coll*, 1999; Puisieux *et coll*, 2000).

D'autres molécules comme les fibrates et les statines reproduisent une neuroprotection préventive dans différents modèles expérimentaux d'ischémie reperfusion

cérébrale (Deplanque *et coll*, 2003). Une étude clinique prospective sur ce sujet a d'ailleurs été achevée en 2004 (FIBSTATIS) au sein du CHRU de Lille. Cette étude a inclus 362 patients admis en urgence pour un AVC. Le travail prospectif consistait à interroger les patients de tous âges (avec une moyenne de 70 ans) pour la prise en compte des facteurs de risque, des traitements pris en cours et en particulier les agents réduisant le profil lipidique (fibrates et statines), l'activité physique et le style de vie des patients (Deplanque *et coll*, 2006). Leurs réponses ont permis de déterminer trois facteurs liés à la réduction de la gravité de l'AVC, même si leur conjonction bénéfique reste à vérifier: la pratique sportive modérée, la prise préalable à l'AVC d'un traitement hypolipémiant, et un antécédent d'accident ischémique transitoire (AIT) de quelques minutes. Ces travaux ont ainsi apporté la confirmation clinique des résultats expérimentaux qui démontrent la possibilité d'induire chez l'animal une neuroprotection préventive.

Les ligands tels que les fibrates et le resvératrol que nous avons décrit précédemment exercent leurs effets via l'activation d'un récepteur nucléaire, le PPAR- α (Inoue *et coll*, 2003). Ce récepteur constitue l'un des trois sous types du récepteur nucléaire PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). Il est exprimé dans les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules endothéliales ainsi que dans le tissu cérébral (Bishop-Bailey, 2000; Cullingford *et coll*, 1998; Kainu *et coll*, 1994; Moreno *et coll*, 2004) et peut être activé par des ligands naturels tels que les acides gras et certains eicosanoïdes ou encore par des ligands synthétiques comme les fibrates (Fruchart *et coll*, 1999). Son activation, qui passe par une hétéro-dimérisation avec le récepteur de l'acide cis-rétinoïque (RXR) et par la liaison à un élément de réponse situé sur l'ADN (Peroxisome Proliferator Responsive Element, PPRE), module de manière directe l'expression de nombreux gènes dont certains sont impliqués dans la régulation de mécanismes liés à la physiopathologie cérébrale comme ceux de la modulation du métabolisme lipidique, du stress oxydant et des processus inflammatoires (**Figure 49**).

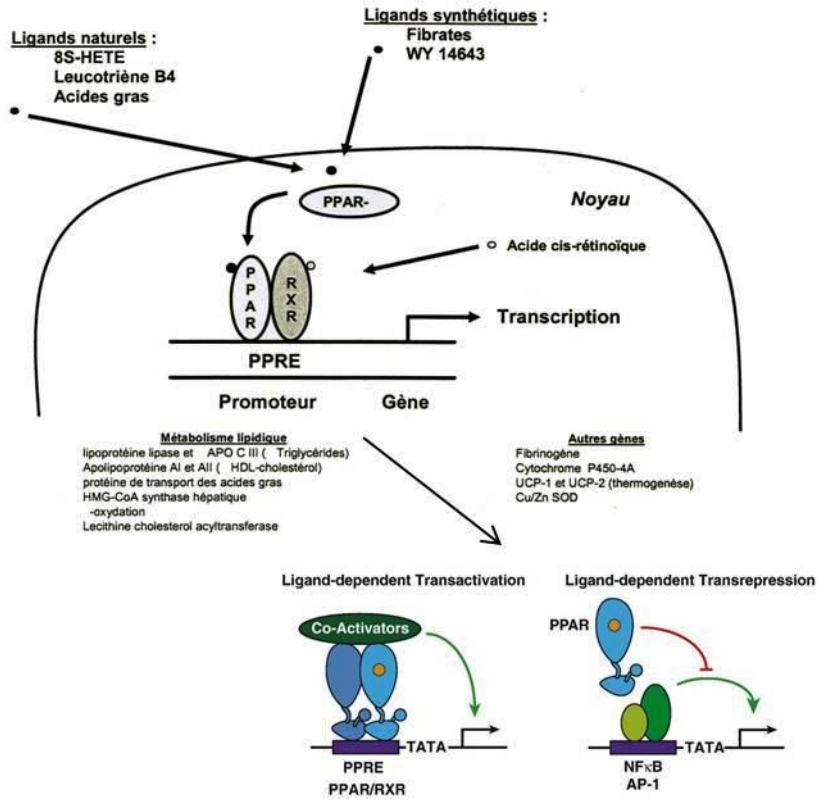


Figure 49: Exemples de modulations transcriptionnelles par le récepteur nucléaire PPAR-α

VIII. Présentation du travail

Le maintien du débit sanguin cérébral est essentiel pour le fonctionnement du cerveau dans les meilleures conditions physiologiques. Dans le cerveau sain, la perfusion locale est en effet parfaitement adaptée à la demande métabolique du tissu cérébral. Au décours du processus d'ischémie reperfusion, le débit sanguin cérébral se trouve profondément modifié dans la zone infarctuée et son rétablissement, lors de la phase de reperfusion, constitue un élément essentiel à la survie de la zone de pénombre ischémique qui se révèle être une zone cible privilégiée sur laquelle les efforts thérapeutiques doivent se concentrer.

Ce travail a pour objectif de mieux comprendre les altérations fonctionnelles post-ischémiques du lit vasculaire cérébral en particulier de l'artère cérébrale moyenne (territoire sylvien chez l'homme) ainsi que leur évolution de la phase aiguë (à 24 heures de reperfusion) à la phase subaiguë (7 jours de reperfusion). Ces résultats sont mis ici en corrélation avec l'évolution des lésions cérébrales et du déficit fonctionnel mis en évidence par l'utilisation de tests comportementaux moteurs et sensori-moteur. Pour ce faire, les deux premières parties de cette étude vont décrire les altérations vasculaires post ischémiques ainsi que leur évolution spontanée par l'utilisation de deux techniques complémentaires. Effectivement, la technique électrophysiologique du patch-clamp a permis d'une part de mettre en évidence les altérations des canaux potassiques du muscle lisse et l'analyse de la réactivité vasculaire par l'artériographe d'Halpern a permis d'étudier d'autre part celles affectant les propriétés actives et les relaxations potassium-dépendante et endothélium-dépendante.

Les observations faites à 24 heures de reperfusion mettent tout d'abord en évidence une altération majeure des différentes fonctions cérébro-vasculaires étudiées, avec la formation de lésions cérébrales quantifiées par histomorphométrie, reflétées par une perte significative des performances comportementales des animaux pour les trois tests utilisés (test du ruban adhésif, test du rotarod et test de la traction préhensile). Ensuite, les altérations ioniques décrites consistent en la forte réduction de la densité de courant des canaux potassiques Kir2.x et Kv avec, concernant les canaux Kv, une majoration de l'altération induite par la voie du NO en conditions d'ischémie reperfusion. Il est aussi mis en évidence une altération des propriétés de relaxation des artères cérébrales moyennes qu'elles soient sous la dépendance du muscle lisse ou de l'endothélium.

L'évolution spontanée des anomalies post-ischémiques de l'ensemble de ces fonctions a ensuite été explorée au cours du temps pendant la phase subaiguë. Les résultats

obtenus montrent une réduction des volumes d'infarctus cortical et de l'œdème accompagnée d'une récupération comportementale partielle. Cette étude met en évidence l'existence d'une plasticité spontanée du muscle lisse vasculaire sous la forme d'une récupération fonctionnelle de la densité de courant Kir2.x ainsi que de sa relaxation potassium-dépendante qui lui est associée, qui s'avère être totale 7 jours après la réalisation expérimentale de l'ischémie cérébrale. Bien que la fonction endothéliale reste altérée, ces résultats soulignent le caractère dynamique de la paroi vasculaire en réponse à la pathologie ischémique.

La phase de reperfusion, suspectée d'être en partie à l'origine des altérations fonctionnelles postischémiques de la paroi vasculaire, nous a conduits à développer une stratégie potentiellement capable de stopper les effets délétères du stress oxydant par l'évaluation des effets de la Stobadine. Cette molécule appartient à la famille des pyridoindoles possédant des propriétés antioxydantes puissantes. Le bénéfice de ce traitement donné à la phase aiguë de l'ischémie reperfusion, 1 heure et 6 heures après l'occlusion, est significatif sur la majorité des paramètres étudiés avec une prévention de l'altération des canaux Kir2.x, de la relaxation endothélium-dépendante, une récupération du diamètre de repos ainsi qu'une accélération de la relaxation potassium-dépendante et de la récupération fonctionnelle motrice et sensori-motrice. Sur la base de travaux déjà réalisés au laboratoire ayant montré des propriétés neuroprotectrices et vasculoprotectrices, nous avons testé les effets antioxydants et anti-inflammatoires du Fénofibrate, agoniste PPAR α , sur les déficits observés à la phase aiguë. Administré pendant 3 jours suite à l'ischémie reperfusion, il permet en parallèle d'une protection cérébro-vasculaire, une récupération fonctionnelle motrice.

L'ensemble de ces travaux dénote l'existence d'une plasticité spontanée lésionnelle, comportementale et vasculaire au cours dès 7 jours suivant le processus d'ischémie reperfusion sur laquelle il est possible d'agir. L'évolution spontanée et simultanée de ces différentes fonctions confirme de surcroît l'existence d'interactions étroites entre-elles perturbées en conditions physiopathologiques. Il est possible pharmacologiquement soit de prévenir les lésions, soit de potentialiser ou en d'autre terme d'accélérer ces processus de récupération. L'amélioration du débit sanguin cérébral au niveau de la zone de pénombre devrait permettre une meilleure adéquation entre d'une part les apports énergétiques réclamés par le tissu cérébral et la mise en place des mécanismes de plasticité au décours de l'ischémie cérébrale.

Matériel
et
Méthodes

I. Animaux

L'ensemble des travaux a été réalisé chez des rats mâles Wistar âgés de 10 semaines. Leur poids, contrôlé lors de la phase de conditionnement des tests comportementaux, est compris entre 280 et 320 grammes en respect des conditions expérimentales du modèle d'ischémie-reperfusion focale. Ils ont été hébergés par groupe de 10 rats dans un environnement contrôlé à 20°C avec une alternance jour-nuit de 12 heures et un accès libre à l'eau ainsi qu'à la nourriture (régime standard).

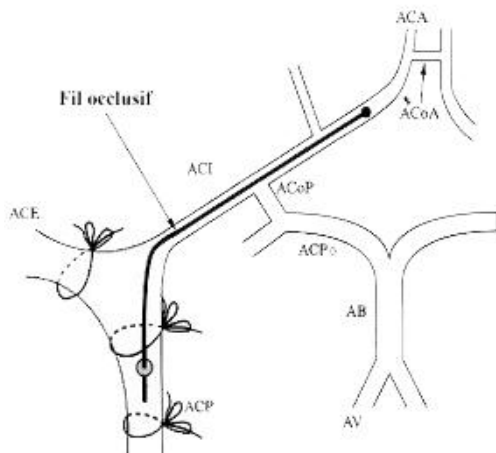
II. Ischémie-reperfusion cérébrale focale chez le rat

Ce modèle expérimental, qui permet de simuler une ischémie cérébrale suivie d'une phase de reperfusion, est l'adaptation d'une technique d'occlusion intra-luminale de l'artère cérébrale moyenne déjà décrite (Longa *et coll*, 1989). Ce modèle d'occlusion présente plusieurs avantages. D'une part l'artère cérébrale moyenne ne subit aucune lésion chirurgicale directe permettant l'étude fonctionnelle de l'artère ainsi que de ses cellules constitutives en phase postopératoire. D'autre part, il permet d'avoir un contrôle total du paramètre temps de l'ischémie qui est de 1 heure dans notre cas d'étude suivie de 24 heures, 3 jours ou 7 jours de reperfusion.

II.A. Modèle d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne

Après anesthésie à l'hydrate de chloral (300 mg/kg par voie intrapéritonéale), une incision est réalisée au niveau de la région cervicale afin d'exposer la bifurcation carotidienne droite. Sous microscope chirurgical (Wild M650, Wild Heerbrugg), la bifurcation carotidienne ainsi que l'artère carotide externe sont disséquées, cette dernière étant ligaturée à son origine. L'artère ptérygopalatine (première branche de division de l'artère carotide interne) est elle aussi disséquée puis ligaturée à son origine. Enfin, la carotide primitive est ligaturée le plus en amont possible de la bifurcation (**Figure 50**). Dans ces conditions, un micro-clip chirurgical est posé sur la partie proximale de la carotide interne. Une artériotomie est alors réalisée en deçà de la bifurcation afin de permettre le passage d'un fil de nylon chirurgical 4/0 (Dafilon[®], Braun) dont l'extrémité est préalablement arrondie à la flamme. Ce filament est sécurisé par une suture sous la bifurcation. Le micro-clip est alors retiré et le fil prudemment avancé dans l'artère carotide interne afin que son extrémité vienne obstruer l'ostium de l'artère cérébrale moyenne, soit une longueur calibrée de 22 mm au-delà de la

bifurcation carotidienne. L'extrémité restante du fil de nylon est disposée soigneusement à l'extérieur de la plaie puis l'incision cervicale est refermée.



ACE : Artère Carotide Externe ; **ACP** : Artère Carotide Primitive ; **ACI** : Artère Carotide Interne ; **ACA** : Artère Cérébrale Antérieure ; **ACM** : Artère Cérébrale Moyenne ; **ACPo** : Artère Cérébrale Postérieure ; **ACoA** : Artère Communicante Antérieure ; **ACoP** : Artère Communicante Postérieure ; **AV** : Artère Vertébrale ; **AB** : Artère Basilaire.

Figure 50: Modèle d'occlusion intraluminaire de l'artère cérébrale moyenne

Après 1 heure, le fil de nylon situé à l'extérieur de la plaie est délicatement retiré par son extrémité restée à l'extérieur. Cette dernière étape marquant le début de la phase de reperfusion, permet le retour de la circulation sanguine dans l'artère cérébrale moyenne par l'intermédiaire du polygone de Willis (**Figure 50**).

Afin de réaliser des groupes sham (non ischémiés), nous avons réalisé les mêmes étapes opératoires hormis l'occlusion (opération blanche). C'est-à-dire que les rats sont anesthésiés, les différentes ligatures (ptérygopalatines, artères carotides externe et primitive) sont placées puis le fil qui servait au maintien du fil d'occlusion en cas d'ischémie sert ici de ligature définitive chez les sham afin de réaliser l'artériotomie sans provoquer d'hémorragie. Ils subissent également, si besoin est, la pose d'un cathéter dans la veine jugulaire droite afin d'assurer les différentes injections de véhicule ou d'agent pharmacologique.

II.B. Paramètres physiologiques

Lors de l'ensemble des procédures chirurgicales, la température des animaux est maintenue à 37 ± 0.5 °C à l'aide d'une table chauffante pendant la durée de l'intervention puis avec une lampe chauffante jusqu'au réveil complet de l'animal. Une surveillance des paramètres physiologiques (pression artérielle et gaz du sang) est par ailleurs réalisée à trois temps particuliers (avant l'ischémie, après 30 minutes et lors de la reperfusion). Les mesures de pression artérielle (transducteur Satham, Gould USA ; moniteur de pression artérielle Micromed 2654) et les prélèvements pour les gaz du sang (tube capillaire et appareil de

mesure Stat profile Ultra, Nova Biomedical) sont réalisés après cathétérisme de l'artère caudale.

III. Histomorphométrie

III.A. Prélèvements et coupes histologiques

L'étude histomorphométrique permet la vérification et la quantification de l'ischémie cérébrale. A la suite des 24 heures, 3 jours ou 7 jours de reperfusion, les animaux sont sacrifiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital. Ils sont ensuite décapités. La boîte crânienne est découpée sagittalement afin de prélever le cerveau. Après dissection des artères cérébrales moyennes, le cerveau est congelé dans l'isopentane à -30°C. Des coupes frontales de 50 µm sont ensuite réalisées avec un microtome réfrigéré (Cryocut 1800, Reichter-Jung) à douze niveaux distants de 1 mm, déterminés à l'aide un atlas stéréotaxique (Paxinos et Watson, 1986) (**Figure 51**).

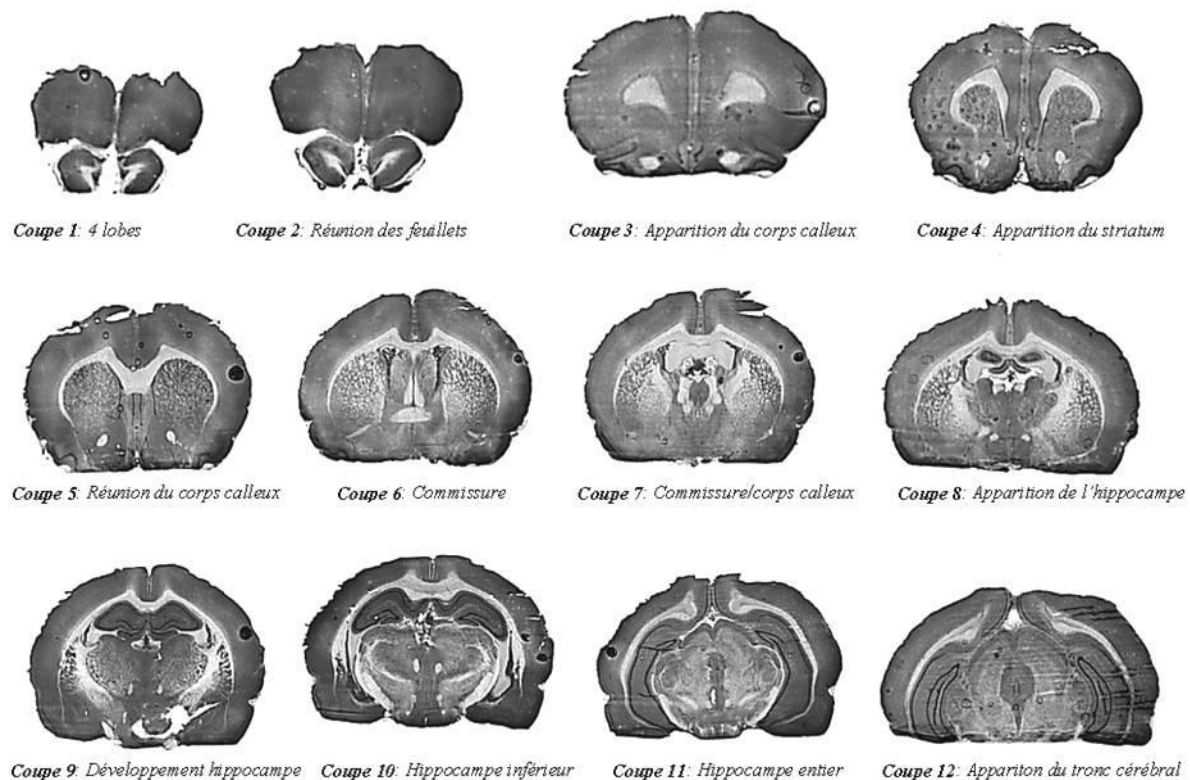


Figure 51: Les différentes coupes nécessaires au calcul du volume de l'infarctus cérébral

III.B. Coloration histologique au crésyl violet

Après fixation dans un mélange formaldéhyde/acide acétique/méthanol (1/1/8, v/v), les coupes sont rincées à l'eau courante pendant 10 minutes puis à l'eau distillée pendant 5 minutes. Les lames sont alors colorées avec du crésyl violet filtré (eau distillée : 80 ml ;

éthanol 100° : 20 ml ; acétate de crésyl violet : 500 mg) pendant 3 minutes puis déshydratées dans des bains d'alcool de titre croissant (éthanol 70°, 95°, 100°) pendant 30 secondes chacun. Enfin les coupes sont éclaircies dans du Clearene® pendant 5 minutes avant montage des lamelles avec de l'Acrytol®.

Le crésyl violet, colorant du groupe des Oxazines, est utilisé comme colorant histologique et permet de différencier facilement les cellules entre elles. Il possède pour cela la propriété de colorer le cytoplasme des cellules en bleu et la chromatine des noyaux en rouge violet.

III.C. Quantification du volume de l'infarctus

A l'examen des lames, les zones non colorées sont considérées comme infarctées (**Figure 52**), la diminution de coloration reflétant une diminution de la densité cellulaire. La mesure de l'aire des surfaces d'intérêt (hémisphère droit, hémisphère gauche, infarctus total, cortical, sous-cortical) est réalisée par le logiciel Colorimage 1.32 (W.Rasband, NIH), après numérisation des coupes histologiques. Les volumes sont calculés par intégration des surfaces mesurées.

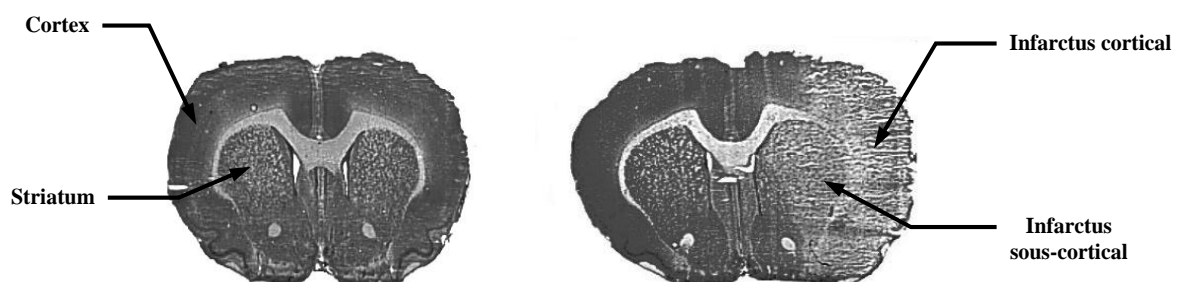
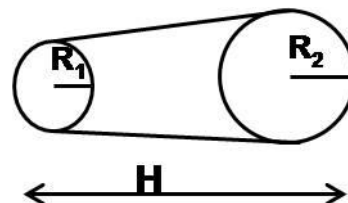


Figure 52: Zones de quantification du volume de l'infarctus

L'intervalle entre les 12 coupes de cerveau peut être considéré mathématiquement comme le volume d'un cône tronqué représenté ci-contre. Le calcul du volume s'effectue légitimement selon la formule :



$$V = \pi \frac{H}{3} (R_1^2 + R_2^2 + R_1 R_2)$$

III.D. Œdème cérébral

L'œdème cérébral est pris en compte par le calcul des volumes corrigés avec la formule suivante (Lin *et coll*, 1993) : volume de l'infarctus corrigé = volume de l'infarctus

mesuré X (volume de l'hémisphère droit lésé / volume de l'hémisphère gauche sain), définition qui pose comme hypothèse que le volume de l'œdème est égal à la différence de volume entre les hémisphères sain et lésé. Cette correction par le rapport entre les deux hémisphères est applicable sur les infarctus total, cortical et sous-cortical.

IV. Protocoles pharmacologiques

IV.A. Protocole expérimental d'administration de la stobadine

La stobadine, cis-(-)-2,3,4,4a,5,9b-hexahydro-2,8-diméthyl-1H-[4,3-b]indole, nous a été fournie par le professeur S Stolc dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut de Pharmacologie Expérimentale de l'Académie Slovaque des Sciences de Bratislava (Horakova et Stolc, 1998). Cette molécule synthétique, qui fait partie de la famille des pyridoindoles, possède à la fois un pôle hydrophile et lipophile (**Figure 53**). Elle se couple aux protéines plasmatiques de façon non spécifique et non saturable et elle franchit la barrière hématoencéphalique (Soltes *et coll*, 2000; Stolc *et coll*, 1997).

Dans le cas propre à l'étude réalisée avec la stobadine, un cathéter est placé au niveau de la veine jugulaire droite pour permettre l'administration du traitement. Afin de le conserver pendant la totalité de la période d'étude pouvant s'étendre jusqu'à 7 jours, celui-ci est passé sous la peau jusqu'au-dessus de la tête où il ressort grâce à une petite incision. Une petite suture est réalisée afin de le maintenir en place.

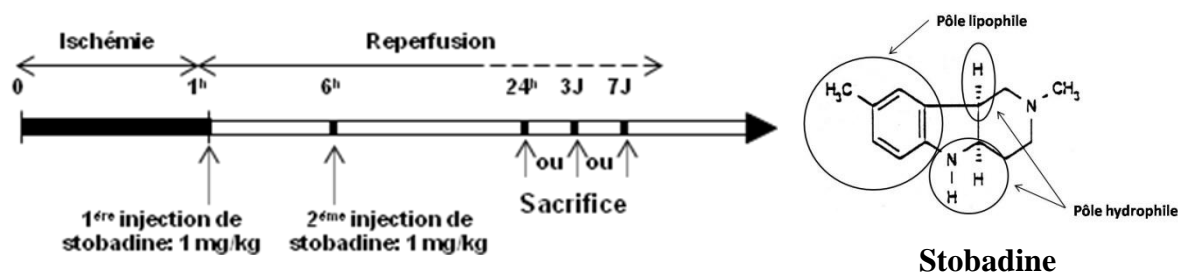


Figure 53: La Stobadine et son protocole expérimental d'administration

Au décours de l'ischémie-reperfusion, les animaux reçoivent deux injections égales par voie intraveineuse représentant une dose totale de 2 mg/kg de poids corporel ou de son véhicule, une solution de chlorure de sodium 0,9%, 1 heure et 6 heures après le début de l'occlusion intra-luminale de l'artère cérébrale moyenne (**Figure 53**).

IV.B. Protocole expérimental du fénofibrate

Le fénofibrate (Sigma-Aldrich Chemical) est un ligand synthétique des récepteurs nucléaires PPAR α . La dose d'administration de 50 mg/kg/j a été testée en période post-

ischémique. Le fénofibrate est dissout dans un véhicule (méthylcellulose) et administré par gavage biquotidien. Le sacrifice des animaux a lieu à 72h de l'ischémie (**Figure 54**).

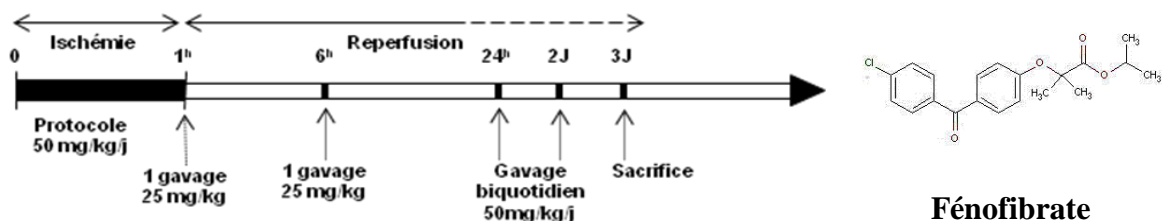


Figure 54: Le Fénofibrate et son protocole expérimental d'administration

V. Étude électrophysiologique de la cellule musculaire lisse de l'artère cérébrale moyenne

V.A. Dissociation des cellules musculaires lisses

L'artère cérébrale moyenne est prélevée dans un milieu de dissociation des cellules musculaires lisses (DCML) à 4 °C puis transférée dans la même solution à température ambiante où elle est coupée en 3 à 4 segments. Le milieu DCML est composé de (en mM) : 136 NaCl ; 5,6 KCl ; 4,17 NaHCO₃ ; 0,1 CaCl₂ ; 10 HEPES ; 1 MgCl₂ ; 0,44 NaH₂PO₄ ; 0,42 Na₂HPO₄ ; 10 glucose, et ajusté au pH = 7,4. La dissociation s'effectue alors par action de traitements enzymatiques successifs. L'artère est ainsi plongée pendant 30 minutes dans un premier bain enzymatique à 37°C, contenant de la papaïne (14 U/mL, 1,5 mg/mL), du dithiothréitol (1 mg/mL), de la sérum albumine bovine (1 mg/mL). Le premier milieu est ensuite aspiré et remplacé par un second milieu enzymatique contenant de la collagénase (1,5 mg/mL), de la BSA (1 mg/mL) et de la hyaluronidase (1 mg/mL) pendant 10 minutes. Après trituration des segments d'ACM avec une pipette Pasteur dans un milieu DCML + BSA (1 mg/mL), les cellules musculaires lisses ainsi libérées sont gardées à température ambiante et utilisées dans les 6 heures qui suivent la dissociation (Bastide *et coll*, 1999).

V.B. Technique de patch-clamp

V.B.1. Principe

La technique du patch-clamp offre la possibilité de visualiser et d'enregistrer en temps réel l'activité électrique membranaire engendrée par les canaux ioniques au niveau d'une cellule entière ou d'un morceau de membrane de cellule (Hamill *et coll*, 1981). Elle conduit à isoler électriquement un fragment de membrane en pressant contre la surface membranaire de la cellule une pipette de verre dont la pointe est de l'ordre de 1 µm. Suite à l'application d'une légère dépression à l'intérieur de celle-ci, on obtient un seal de résistance

électrique très élevée ($R_{\text{seal}} > 1 \text{ G}\Omega$) : le gigaseal, permettant d'imposer un potentiel à la membrane et, simultanément, de mesurer des fluctuations de courant inférieures de l'ordre du picoampère (pA).

A l'intérieur de cette pipette est disposée une électrode d'argent chlorurée (Ag/AgCl) qui convertit les courants ioniques en flux d'électrons dans le métal. Elle est reliée à un amplificateur (RK 400, Bio-Logic) qui permet de mesurer des courants électriques de faible amplitude puis de les convertir en tension analogique. Le signal enregistré est débarrassé du bruit parasite par un filtre passe-bas à 3 kHz, avant d'être échantillonné à 6,65 kHz puis numérisés au travers d'un convertisseur analogique-numérique. L'ensemble est connecté à un système informatique (486 IBM) muni d'une carte d'acquisition (Labmaster TL-1, Scientific Solution Inc) équipé du logiciel pClamp 5.5 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA). Le microscope inversé (Olympus) est placé avec le micromanipulateur hydraulique servant à l'approche de la pipette ainsi que le système de perfusion des milieux extracellulaires (RSC 200, Rapid solution changer Bio-Logic) dans une cage de Faraday. L'ensemble est mis à la terre pour limiter les parasites électriques. Le système est amorti par une table antivibratile afin d'éviter toutes perturbations mécaniques extérieures. Les micropipettes sont étirées à partir de capillaires de verre borosilicaté (Clark Electromedical Instruments) de telle façon qu'elles possèdent une géométrie et une résistance électrique de 2 à 3 M Ω après remplissage par la solution intrapipette. Ces conditions permettent l'obtention d'enregistrements des courants ioniques de la cellule musculaire lisse à travers les configurations membranaires explicitées par la suite. L'analyse des données électrophysiologiques est finalement réalisée par le programme Clampfit 9.2.

V.B.2. Les différentes configurations membranaires utilisées

Une fois obtenu, le gigaseal entraîne la stabilité mécanique de l'ensemble pipette-cellule et induit une forte barrière de diffusion des ions du milieu intrapipette vers le milieu extracellulaire. Il se forme alors deux compartiments isolés dont il est possible, selon les conditions expérimentales choisies, de faire varier la composition ionique et chimique. La configuration membranaire appelée cellule entière (whole-cell) ainsi que sa variante perforée ont ici été utilisées dans le but d'étudier respectivement les courants Kir2.x et Kv de la cellule musculaire lisse.

Elles conduisent à déterminer le comportement moyen d'un canal, à partir du comportement global d'une population de canaux. Le courant global I_{ion} ainsi enregistré, dépendant étroitement du gradient électrochimique ($E_m - E_{\text{ion}}$), est fonction du nombre N de canaux ainsi que de la probabilité d'ouverture P_o de ces canaux selon l'équation :

$$I_{ion} = \gamma_{ion} \cdot N \cdot P_o \cdot (E_m - E_{ion})$$

V.B.2.a. La configuration cellule entière (fast whole-cell recording)

Cette configuration a été utilisée dans le but d'étudier le courant Kir2.x. La formation initiale du gigaseal est suivie d'une rupture de la membrane obtenue par l'application d'une forte dépression à l'intérieur de la pipette (**Figure 55**). La rupture crée une voie de communication entre la pipette et le cytosol, et entraîne la diffusion progressive du milieu intrapipette dans le cytoplasme tout au long de l'enregistrement. Il est alors possible d'enregistrer des courants macroscopiques résultant de l'activité de N canaux répartis sur l'ensemble de la membrane.

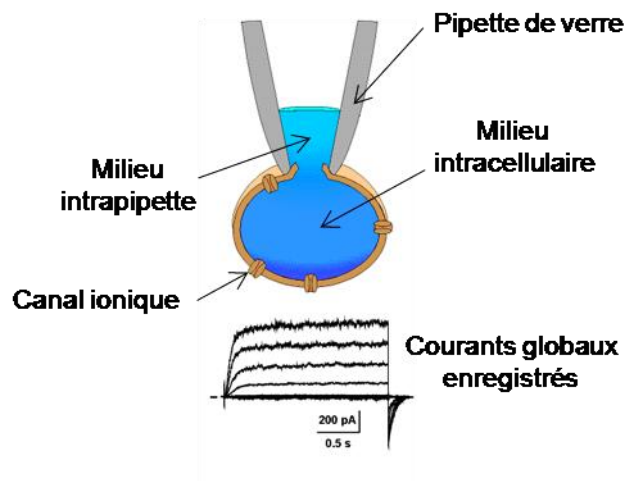


Figure 55 : Configuration whole-cell

Aussi complexe soit-il, le milieu intrapipette synthétique ne peut pas contenir tous les métabolites nécessaires au fonctionnement normal de la cellule. Il s'opère ainsi par exemple une perte éventuelle de facteurs de régulation ou encore une modification du niveau de phosphorylation de certains canaux dont l'activité alors diminue. Ce phénomène qui concerne les courants membranaires appelé "run down" constitue une faiblesse majeure de cette configuration.

V.B.2.b La configuration patch-perforée (slow whole-cell recording)

Cette configuration a été utilisée dans le but d'étudier la voie de signalisation cellulaire impliquant les canaux Kv. Elle conduit, contrairement à la configuration cellule entière, non pas à rompre mais à perforer par la création de canaux artificiels le fragment contenu dans la pipette. Cela permet ainsi d'imposer un potentiel à la membrane tout en maintenant le contenu cellulaire en molécules actives. Elle est permise ici par la mise en solution d'un antibiotique polyénique, l'amphotéricine B à la concentration de $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

dans la solution intrapipette (**Figure 56**). Solubilisé dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'amphotéricine B agit sous forme de micelles qui s'insèrent sans pénétrer dans le cytosol entre les molécules de cholestérol et d'ergostérol de la bicouche lipidique du fragment membranaire contenu dans la pipette. Elles forment alors des pores de 8 Å de diamètre qui, perméables aux petits cations monovalents (Na^+ , K^+ ...) mais pas aux cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}), ne sont pas sensibles au potentiel assurant la stabilité électrique du système. Un état stable est ainsi obtenu environ 10 minutes après la formation du seal et l'enregistrement des courants macroscopiques peut ainsi débuter. Ce passage différé dans le temps est ainsi qualifié de mode lent (slow whole cell recording) par comparaison à la configuration précédente qui est rapide, l'enregistrement débutant alors dès la rupture de la membrane.

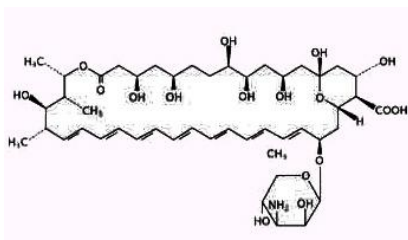


Figure 56: structure de l'amphotéricine B

V.B.3. Composition des milieux utilisés

Les milieux intrapipette (intracellulaire) et extracellulaire (perfusion) sont élaborés dans le but d'enregistrer les courants potassiques et de respecter au mieux les conditions biologiques.

Ainsi, le milieu intrapipette est constitué de (en mM) : 130 KCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, 5 phosphocreatine, pH 7,3. L'amphotéricine B, stockée sous forme d'une solution mère de 25 mg/ml dans le DMSO, est utilisée à une concentration finale de 200 µg/ml après dilution extemporanée puis sonication prolongée.

Le milieu standard de perfusion extracellulaire est quant à lui composé de (en mM) : 134 NaCl, 6 KCl, 1 MgCl₂, 0,1 CaCl₂, 10 HEPES, pH 7,4. Dans nos conditions expérimentales, le potentiel de pile des ions K^+ était évalué d'après l'équation de Nernst à -77,7 mV.

V.C. Etude des courants potassiques de la cellule musculaire lisse

V.C.1. Les canaux potassiques de la cellule musculaire lisse

Au niveau des cellules musculaires lisses, quatre types de canaux sont sélectifs au potassium : les canaux K^+ dépendants du potentiel de membrane (K_v), les canaux K^+ dépendants du calcium intracellulaire (KCa), les canaux K^+ dépendants de l'ATP (K_{ATP}) et enfin les canaux K^+ rectifiants entrants (K_{ir}). Différentes stratégies associant des protocoles

de stimulation membranaire et des milieux d'enregistrement spécifiques ont été utilisés dans le but d'isoler les différents courants étudiés et de caractériser des régulations potentielles par des voies de signalisation intracellulaire. Ces protocoles de stimulation changent l'état électrique de la membrane provoquant les mouvements ioniques au travers des canaux transmembranaires en fonction du gradient électrochimique (driving-force).

Pour tous les enregistrements, une mesure préalable de la capacité membranaire est effectuée par intégration du signal capacitif obtenu par l'application d'un saut de potentiel de -5 mV à partir du potentiel de repos imposé de -60 mV (**Figure 57**). La capacité membranaire mesurée en pF reflétant la surface membranaire, permet de normaliser les amplitudes de courant en densité de courant (pA/pF) et de s'affranchir ainsi de la différence de taille entre les cellules étudiées

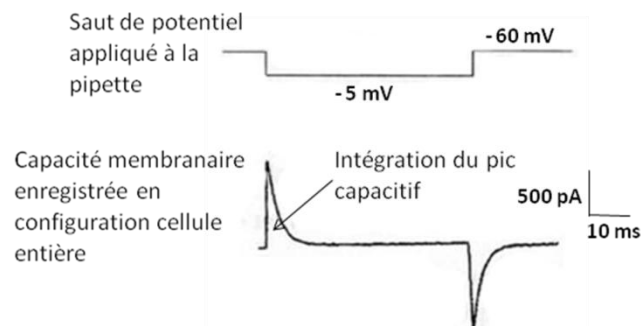


Figure 57: Mesure de la capacité membranaire

Les valeurs de capacités membranaires ainsi que le nombre de cellules enregistré en patch-clamp et d'animaux utilisés correspondants pour l'étude électrophysiologique sont regroupées au sein du **Tableau 1**. Les cellules issues des groupes sham traités par le véhicule et par le fénofibrate possèdent des capacités membranaires similaires et stables au cours de la période d'étude et ont été regroupées respectivement entre elles. Aucune différence significative de valeurs de capacité membranaire n'est retrouvée entre les différents groupes.

Groupes	Capacités membranaires (pF) ± SEM	Nombre de cellules enregistrées	Nombre de rats utilisés
SHAM-VEH	19,39 ± 0,68	9	4
I/R VEH	24 heures 20,53 ± 0,71	11	6
	3 jours 21,16 ± 0,75	7	5
	7 jours 22,92 ± 1,02	6	5
SHAM-STO	21,21 ± 0,31	9	4
I/R-STO	21,22 ± 0,65	16	6
SHAM Cell entière	20,78 ± 0,47	11	8
I/R 24h Cell entiere	18,91 ± 1,91	8	8
SHAM Patch Perforé	22,61 ± 1,10	8	6
I/R 24h Patch Perforé	21,10 ± 0,71	7	5
SHAM DEANONOate 10 µM	20,58 ± 0,85	4	3
I/R 24h DEANONOate 10 µM	21,95 ± 1,51	5	4
SHAM DEANONOate 100 µM	18,45 ± 0,86	3	2
SHAM 8-BrGMPc	19,34 ± 2,04	5	5
I/R 24h 8-BrGMPc	20,66 ± 0,98	7	4
SHAM T-1032	21,54 ± 0,68	7	4
I/R 24h T-1032	20,89 ± 0,70	7	4
SHAM ODQ	20,60 ± 0,40	7	3
I/R 24h ODQ	23,72 ± 1,41	5	3

Tableau 1: Valeurs des capacités membranaires des différents groupes de cellules au cours des différents enregistrements par la technique du patch-clamp

L'ensemble de l'étude électrophysiologique a été effectuée en configuration cellule entière. La membrane d'une cellule contenant rarement une seule population de canaux, il est impératif de créer, dans chaque cas, les conditions expérimentales optimales pour en déduire au final l'activité du courant associé à la population de canaux souhaités.

V.C.1.a. Enregistrement du courant Kir2.x

Cette composante ionique présentant une propriété de voltage-dépendance, les courants Kir2.x ont été ici enregistrés en réponse à des variations de potentiel membranaire par la configuration cellule entière. Un protocole de stimulation dépolarisant en rampe a été choisi, à partir d'un potentiel de maintien de -60 mV jusqu'au potentiel de +50 mV, pendant une durée de 180 ms (**Figure 58**).

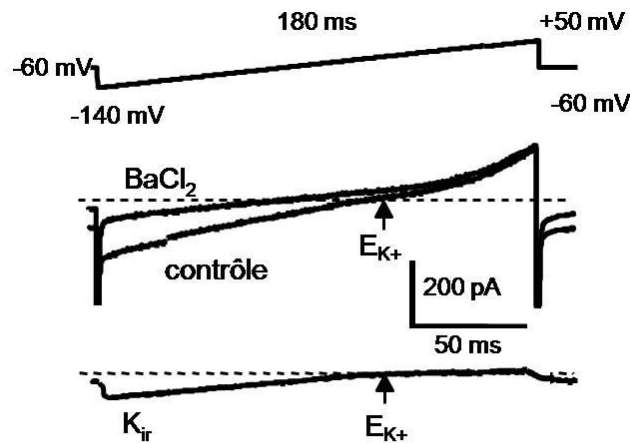


Figure 58: Protocole de stimulation pour l'enregistrement du courant Kir2.x

Afin d'isoler le courant Kir des autres courants engendrés par les trois autres types de canaux potassiques, un bloqueur spécifique du courant Kir, le baryum, est appliqué dans le milieu de perfusion (0,5 mM) (Bastide *et coll*, 1999; Quayle *et coll*, 1993). Le courant Kir2.x est ainsi mis en évidence par soustraction des traces enregistrées en milieu standard et en milieu avec baryum. La courbe rapportant la densité de courant Kir2.x en fonction du potentiel de membrane imposé est alors tracée puis les valeurs à -135 mV, potentiel pour lequel la densité de courant est maximale, sont relevées sous forme d'histogramme.

V.C.1.b. Enregistrement du courant Kv

Dans le but de caractériser l'activité des canaux potassiques voltage-dépendants, un protocole a tout d'abord été mis au point pour isoler le plus spécifiquement possible leur activité. Elle est enregistrée en réponse à des sauts de potentiels de 250 ms allant de -50 mV à +60 mV par incrément de 10 mV, à partir d'un potentiel de maintien de -67 mV (**Figure 59**). Ce protocole de stimulation, lancé pour chaque perfusion de milieu extracellulaire distinct, permet d'activer majoritairement un courant Kv ainsi qu'un courant KCa de forte amplitude (BKCa). Dans le but de s'affranchir de cette dernière composante, l'ibériotoxine (100 nM), est additionnée à chaque perfusion de milieu extracellulaire pendant l'intégralité des enregistrements pour la bloquer spécifiquement.

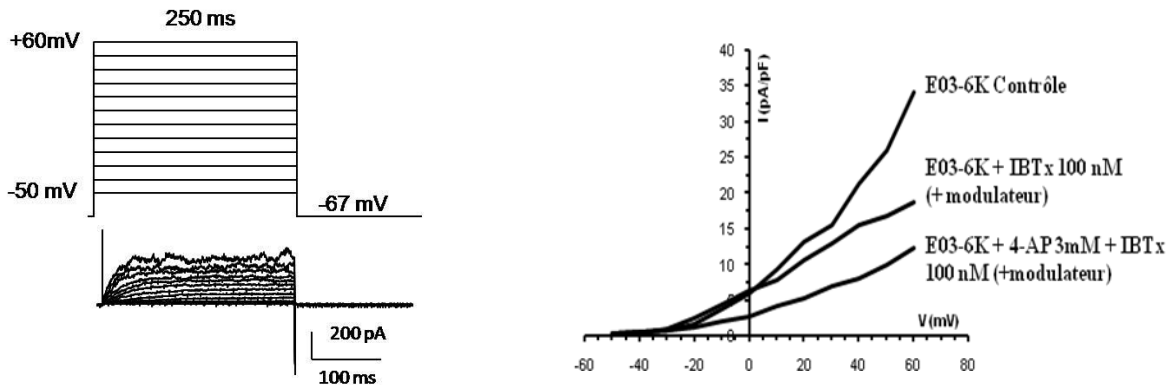


Figure 59: Blocage séquentiel et protocole de stimulation pour l'enregistrement du courant Kv

Une fois la configuration whole-cell établie, un premier milieu de perfusion composé de milieu standard E03-6K et d'ibérotisine est appliqué sur la cellule musculaire lisse. Suite à cette première étape et dans le but d'évaluer des régulations potentielles du courant Kv, un milieu extracellulaire contenant de l'ibérotisine additionné d'un modulateur du courant Kv peut être appliqué (**voir Tableau 2**). Enfin, un milieu composé de 4-aminopyridine (3mM) termine l'enregistrement pour bloquer sélectivement les canaux Kv. Les valeurs de courant prises en compte sont celles de l'état stationnaire atteint lors du temps d'enregistrement de 250 ms. La soustraction des deux dernières traces permet de révéler spécifiquement la densité de courant Kv puis de tracer la courbe rapportant celle-ci en fonction du potentiel de membrane imposé.

V.C.2. Les différents modulateurs du courant Kv utilisés

Tous les composés étaient fournis par la société SIGMA. A l'exception du DEANONOate pesé extemporanément, tous les produits étaient aliquotés en solution de stockage et dilués à la concentration de travail dans le milieu de perfusion au moment de l'enregistrement. Pour les substances dissoutes dans le DMSO, des enregistrements témoins en présence de DMSO seul dans la même proportion étaient effectués pour vérifier l'innocuité (**Tableau 2**).

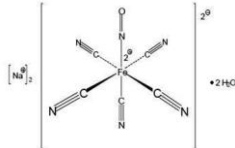
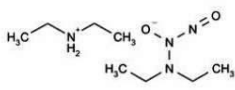
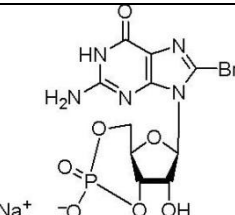
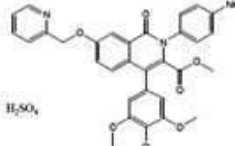
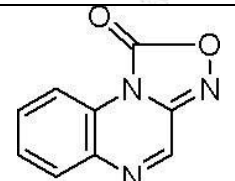
Composé	Structure moléculaire	Propriété du composé	Solubilité/Solution de stockage	Concentration dans le milieu de perfusion extracellulaire
SNP Sodium Nitroprusside dihydrate		Donneur de NO	Eau / 10 mM	10 µM
DEA NONOate Diethylamine NONOate diethylammonium salt		Donneur de NO	Eau / préparation extemporanée	10 µM
8-BrGMPc 8-Bromoguanosine 3'5'-cyclic monophosphate sodium salt		Analogue du GMPc, activateur des protéines kinases GMPc-dépendantes	Eau / 50 mM	100 µM
T-1032		Inhibiteur spécifique de la phosphodiesterase 5	DMSO / 10 mM	100 nM (0,1% DMSO)
ODQ 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one		Inhibiteur sélectif de la guanylate cyclase soluble	DMSO / 25 mM	10 µM (0,04% DMSO)

Tableau 2: Les différents modulateurs utilisés

VI. Méthodes d'analyse de la fonction vasculaire cérébrale

VI.A. Prélèvement de l'artère cérébrale moyenne

VI.B. Artériographe d'Halpern

VI.B.1. Principe du système

Ce système permet l'étude de la réactivité aux variations de pression sur des vaisseaux isolés de petit calibre couplé à un suivi vidéo en continu du diamètre vasculaire. L'analyse est réalisée avec un artériographe d'Halpern (modèle CH/2/A, Living System Instrumentation). Deux canules de verre d'un diamètre d'environ 125 µm permettent de placer une artère de petit calibre de 100 à 300 µm de diamètre. La canule proximale est connectée à un capteur de pression (P2) relié à un contrôleur de flux qui se compose d'une micro-pompe péristaltique (P270, Instech) et une interface de contrôle de pression (Pressure Servo Control, Living System Instrumentation). La canule distale est fermée afin d'effectuer l'analyse en l'absence de flux. Le système maintient la pression intraluminaire constante.

Après le montage de l'artère, l'artériographe est disposé sur un microscope à focale inversée (Leica DMIL) équipé d'une caméra vidéo (Sony MPT-M308CE) reliée à une interface d'analyse de contraste (Video Dimension Analyser, modèle V94). Après étalonnage du système vidéo au moyen d'une cellule de Thomas gravée par tranches de 25 et 50 μm , le diamètre intraluminal et les épaisseurs droite et gauche de l'artère sont enregistrés sur cassette numérique (Biologic DTR 1205). Au circuit de perfusion intraluminale vient s'ajouter un second circuit permettant la perfusion de solution saline maintenue à 37 °C dans la cuve de l'artériographe (**Figure 60**).

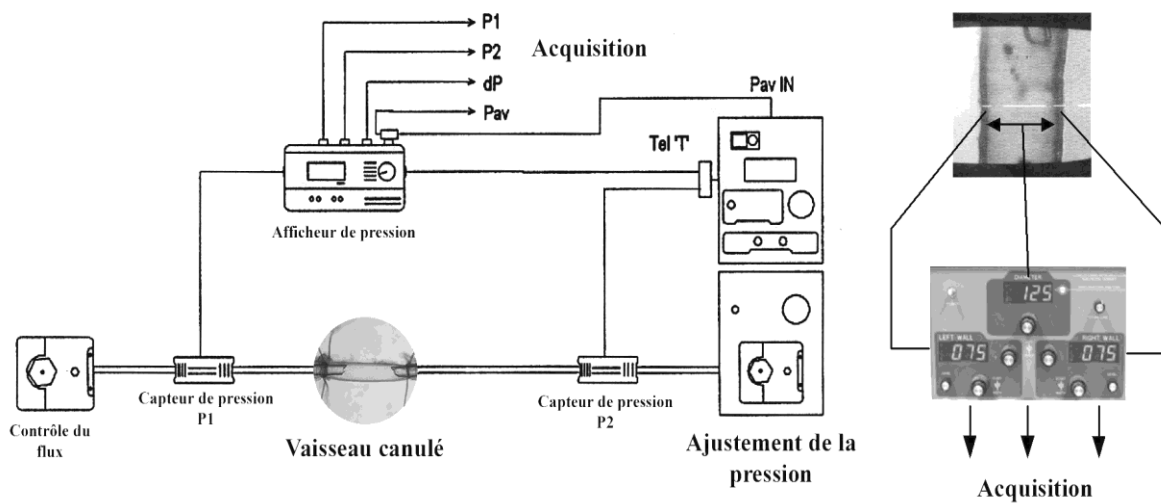


Figure 60: Principe de l'artériographe d'Halpern

VI.B.2. Canulage de l'artère cérébrale moyenne

Le montage de l'artère cérébrale moyenne est réalisé dans la cuve de perfusion de l'artériographe contenant la solution physiologique saline soumise aux mêmes conditions de température et d'oxygénation qu'au moment du prélèvement. Le montage s'effectue sous une loupe binoculaire à grossissement x40 et l'oxygénation doit être permanente tout au long de la procédure (**Figure 61**). Un léger flux de solution saline au sein de la canule proximale permet l'écoulement du sang de l'artère au moment de l'approche sur la canule. La rapidité de l'opération est déterminante pour la viabilité de l'artère, en cas de coagulation du sang dans le vaisseau, l'expérience est abandonnée. Le choix du terrain d'étude vasculaire doit être vierge de collatérales afin d'observer l'étanchéité du montage. Les ligatures sur chaque canule assurent à la fois l'étanchéité et le maintien du montage. Le système est finalement disposé sur la platine d'un microscope à focale inversée et la cuve de l'artériographe est perfusée par la solution saline maintenue à 37 °C. L'artère est stabilisée à une pression intraluminale de 25 mmHg pendant une heure.

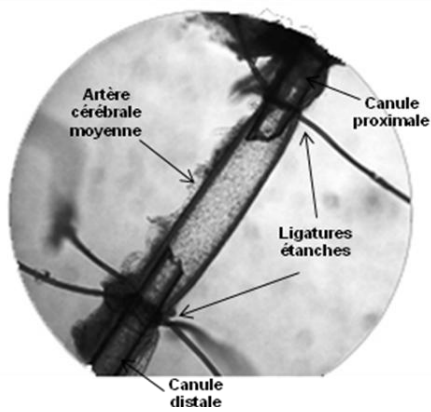


Figure 61: Canulage de l'artère cérébrale moyenne

VI.C. Protocoles d'étude de la réactivité vasculaire

VI.C.1. Le tonus myogénique de l'artère cérébrale

Après la période de stabilisation à 25 mmHg pendant environ 1 heure, la pression intraluminale est augmentée par palier de 25 mmHg jusqu'à 100 mmHg. Le diamètre évolue vers un diamètre constant (tendance à la contraction) en luttant contre l'élévation de pression. Ce phénomène est actif et implique essentiellement le muscle lisse : c'est l'autorégulation. La durée des paliers est d'environ 4-5 min jusqu'à l'apparition d'un état stable. Afin d'évaluer l'amplitude de la contraction lors de ce phénomène actif, il est nécessaire de mesurer l'élasticité propre du vaisseau correspondant aux propriétés passives de la structure vasculaire. Pour cela, la papavérine (10^{-5} M), inhibiteur non spécifique des phosphodiésterases est ajoutée afin de bloquer la fonction contractile du muscle lisse lors des variations de pression de 25 à 100 mmHg (**Figure 62**). Pour des raisons de toxicité, la papavérine est utilisée à la fin du protocole expérimental.

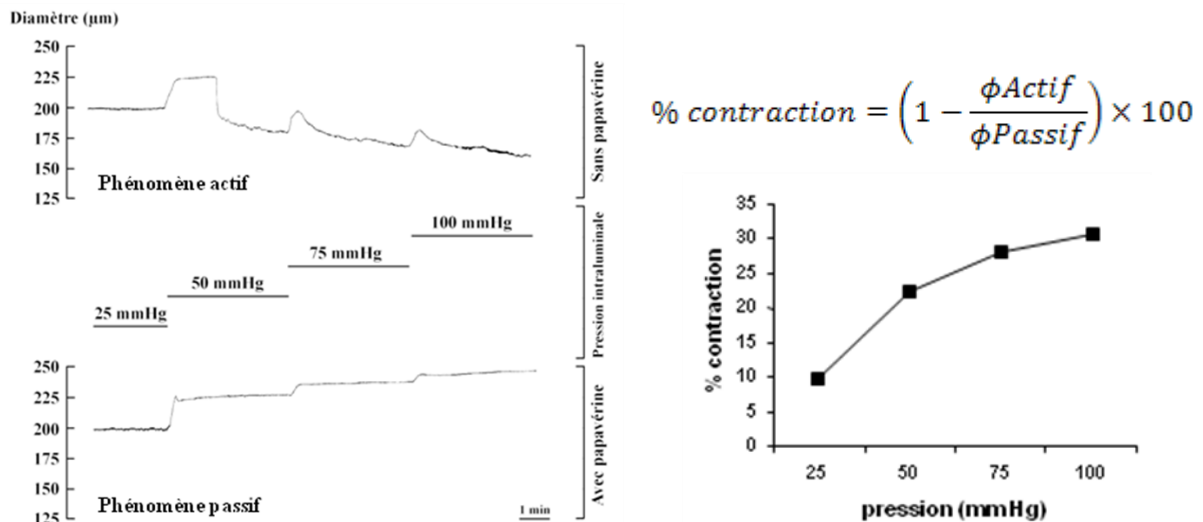


Figure 62: Etude vasculaire du tonus myogénique

Les valeurs expérimentales du diamètre de l'artère mesurées à partir des états stables à chaque pression, permettent le calcul d'un pourcentage de contraction. Ces pourcentages correspondent à la réponse myogénique pour chaque pression (**Figure 62**). La comparaison des phénomènes actif et passif possède l'avantage de normaliser la réponse myogénique en s'acquittant des variations passives du diamètre de l'artère.

VI.C.1.a. Etude de la relaxation musculaire lisse potassium-dépendante sensible au Ba²⁺

Après stabilisation de l'artère à la pression intraluminale de 75 mmHg, on applique de façon progressive dans la cuve d'enregistrement une solution de KCl (15 mM) par l'intermédiaire de la solution physiologique saline de perfusion oxygénée et maintenue à 37°C. Celle-ci permet l'activation des canaux potassiques Kir2.x et induit la vasorelaxation associée (**Figure 63**).

Le baryum (75 µM), un inhibiteur des canaux potassiques Kir2.x, est ajouté à la solution saline KCl 15 mM puis perfusée à la suite. La relaxation potassium-dépendante due à l'activation des canaux Kir2.x est estimée selon la formule suivante :

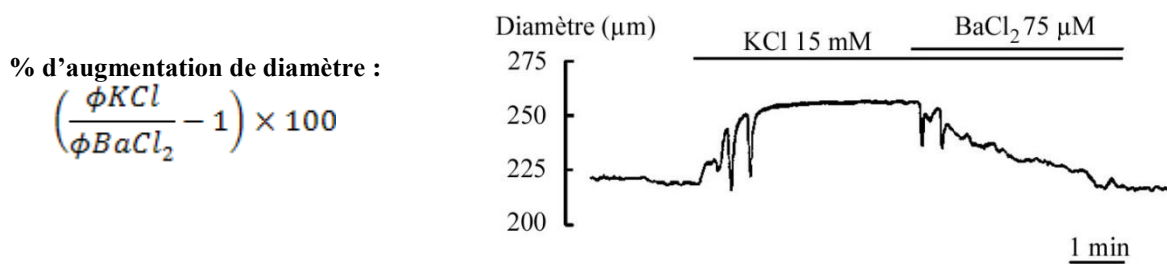


Figure 63: Etude vasculaire du mécanisme relaxant Kir2.x-dépendant

VI.C.1.b. Etude de la vasoconstriction et de la vasodilatation endothélium dépendante

Après stabilisation de l'artère à la pression intraluminale de 75 mmHg, on applique de la sérotonine (5-HT) à la concentration de 10^{-6} M ou de l'acétylcholine (ACh) à la concentration de $3 \cdot 10^{-5}$ M permettant respectivement d'induire une vasoconstriction ou une vasodilatation dépendante de l'endothélium. Une pré-constriction de l'artère par l'application de sérotonine (5-HT : 10^{-6} M) amenant à 90% de sa constriction maximale est réalisée au préalable de l'application d'acétylcholine, afin de s'affranchir de la libération basale de facteurs endothéliaux relaxants.

% d'augmentation de diamètre induit par l'ACh:

$$\left(\frac{\phi_{ACh}}{\phi_{5HT}} - 1 \right) \times 100$$

% de contraction induit par 5-HT:

$$\left(1 - \frac{\phi_{5HT}}{\phi_{Repos}} \right) \times 100$$

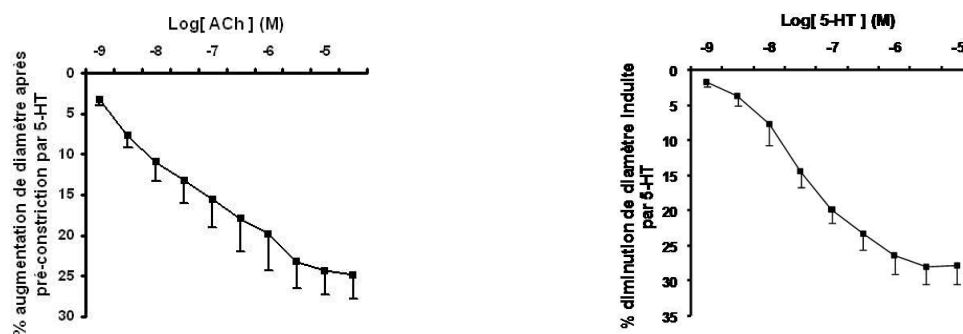


Figure 64: Vasoconstriction et vasodilatation dépendantes de l'endothélium

VI.C.1.c. Etude de la relaxation endothélium-indépendante et contrôle de la viabilité de l'artère cérébrale

Après stabilisation de l'artère à la pression intraluminale de 75 mmHg, la relaxation endothélium-indépendante est évaluée par l'application d'une dose unique maximale de sodium nitroprusside (SNP 10 μ M) précédée une fois encore d'une pré-constriction à la sérotonine. Cette dose de SNP provoque une relaxation musculaire lisse

maximale. Cette opération permet en outre de tester l'intégrité de la fonction musculaire lisse en réponse au monoxyde d'azote (NO).

Cet effet, lorsqu'il est exprimé en pourcentage de relaxation (rapport entre le pourcentage de variation de diamètre et le diamètre de repos), est supérieur à 100%. Ces résultats s'expliquent par le fait que la pré-contriction maximale induite par la sérotonine (10^{-6} M) préalablement à l'application de SNP, s'ajoute à un diamètre développant déjà spontanément un tonus myogénique et donc un certain niveau de contraction. Si on considère qu'une relaxation est au maximum de 100 % comme il est légitime de le penser, alors la différence entre le résultat expérimental exprimé en pourcentage de relaxation et le pourcentage théorique de 100 % au maximum, correspond à la contraction spontanée de l'artère à l'état de repos.

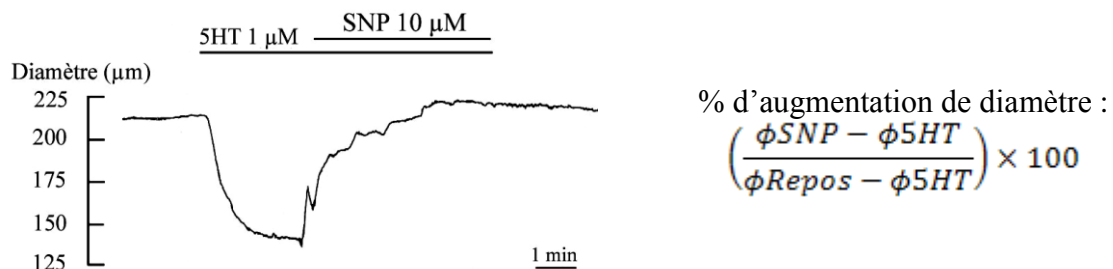


Figure 65: Vasorelaxation endothélium indépendante induite par l'application de SNP 10 µM

VII. Les tests comportementaux

Trois tests comportementaux ont été utilisés dans le but d'évaluer dans le temps les déficits sensitifs et/ou moteurs induits par l'ischémie-reperfusion. Ces tests ont été effectués à 24 heures, 3 jours ou 7 jours de reperfusion selon les groupes d'animaux sham ou ischémiés-reperfusés, traités par la stobadine ou par le fénofibrate ou par leurs véhicules respectifs (voir pour les protocoles expérimentaux : **Figure 53 et Figure 54, page 107** et pour les tests comportementaux utilisés pour chaque groupe **Figure 69, page 124** : placés dès leur arrivée à l'animalerie et les différents protocoles comportementaux ne commencent qu'une fois les animaux habitués à leur nouvel environnement.

VII.A. Test du rotarod

Ce test, qui requiert une phase de conditionnement préalable, permet d'évaluer les fonctions motrices de l'animal par sa capacité à adapter ses mouvements pour maintenir sa position initiale sur un cylindre qui tourne (Hamm *et coll*, 1994; Zhang *et coll*, 2000).

VII.A.1. Principe du test

Le rat est déposé sur un cylindre qui tourne sur lui-même (**Figure 66**). Sa vitesse de rotation est accélérée de façon progressive et constante. Il a été ici choisi une accélération de 1 à 40 tours par minute pendant une période expérimentale de 120 secondes.



Figure 66: Test du rotarod

VII.A.2. Phase de conditionnement

Cette étape, qui s'étend sur une période de 3 jours à raison d'au moins 4 fois par jour, consiste à habituer l'animal à l'augmentation progressive de la vitesse du cylindre. La tâche est considérée comme acquise quand le rat est capable de tenir au minimum 60 secondes (20 tours par minute) sur celui-ci sans aucune chute. Ceux n'arrivant pas à atteindre la durée requise ou qui refusent de participer au test sont exclus du protocole.

VII.A.3. Système d'évaluation

L'indice de performance est le temps correspondant à la chute de l'animal. Alors que le rat sham atteint des valeurs maximales, un rat ischémié reperfusé essaye de coordonner ses mouvements pour tenir le plus longtemps possible sur le cylindre. Un temps de chute faible étant révélateur d'un état moteur affecté suite à l'ischémie reperfusion.

VII.B. Test du ruban adhésif (adhesive removal test)

Ce test, qui requiert une phase de conditionnement préalable, permet de mesurer la sensibilité et l'intégration sensorimotrice de l'animal (Chen *et coll*, 2001; Schallert *et coll*, 1986).

VII.B.1. Principe du test

Un morceau d'adhésif de dimension standard d'environ 1,2 cm² (113,1 mm²) est placé sur les poignets des deux pattes antérieures, où il n'y a pas de poils. Le rat est ensuite placé dans une cage, cette étape marquant le début du chronométrage des temps de retrait des morceaux d'adhésif (**Figure 67**). La tâche est acquise lorsque l'animal réussit à retirer les 2 morceaux de ruban adhésif en un temps inférieur à 10 secondes avec un temps expérimental

maximal de 120 secondes. En parallèle, les tentatives de retrait sont observées et prises en compte et permettent d'établir un score.



Figure 67: Test du ruban adhésif

VII.B.2. Phase de conditionnement

Préalablement à la réalisation de l'ischémie, l'animal doit suivre un apprentissage lui permettant de retirer les morceaux d'adhésifs en moins de 10 secondes. Pour cela, il a été observé au laboratoire que l'animal est apte suite à 3 jours de conditionnement, à raison de 5 fois par jour et à un intervalle minimal de 5 minutes entre chaque essai. Les rats ne réussissant pas cette phase de conditionnement étaient exclus de ce protocole.

VII.B.3. Système d'évaluation

Le comportement de l'animal peut ainsi être évalué selon deux paramètres : la tentative de retrait et le temps de retrait des morceaux adhésifs. Un système de score graduel prend en compte ces deux paramètres, reflétant pour le score 0 un mauvais état sensorimoteur suite l'ischémie-reperfusion et un score 5 pour un état témoin.

- Score 5 :** Le rat retire les deux morceaux de ruban adhésif quelque soit l'ordre de retrait en moins de 120 secondes.
- Score 4 :** Le rat retire le morceau de ruban adhésif du côté ipsi-latéral et essaye du côté contra-latéral.
- Score 3 :** Le rat retire le morceau de ruban adhésif du côté ipsi-latéral mais n'essaye pas du côté contra-latéral.
- Score 2 :** Le rat ne retire aucun des deux morceaux de ruban adhésif mais tente à la fois du coté contra-latéral et ipsi-latéral.
- Score 1 :** Le rat ne retire aucun des deux morceaux de ruban adhésif mais tente le retrait du côté ipsi-latéral.
- Score 0 :** Le rat n'essaye pas de retirer les deux morceaux de ruban adhésif.

VII.C. Test de l'agrippement (prehensile traction task)

Ce test permet d'apprécier les réactions tactiles et proprioceptives des membres antérieurs ainsi que de la tonicité musculaire de l'animal en condition témoin et d'ischémie-reperfusion.

VII.C.1. Principe du test

Il consiste en la suspension du rat par ses pattes antérieures sur une barre de métal cylindrique (60 cm de long, 0,3 cm de diamètre et à environ 40 cm de hauteur) placée à l'horizontale (**Figure 68**). Lorsque le rat est lâché, les déplacements éventuels de l'animal sur la barre sont observés et le temps de chute est mesuré (Zausinger et coll, 2000).

À la différence du test du ruban adhésif, celui-ci n'est réalisé qu'une seule fois pour chaque rat soit à 24 heures, à 3 jours et à 7 jours de reperfusion.

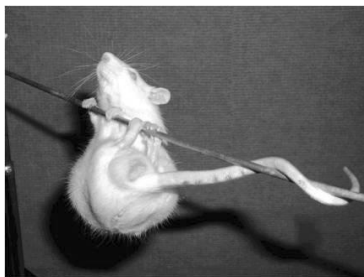


Figure 68: Test de l'agrippement

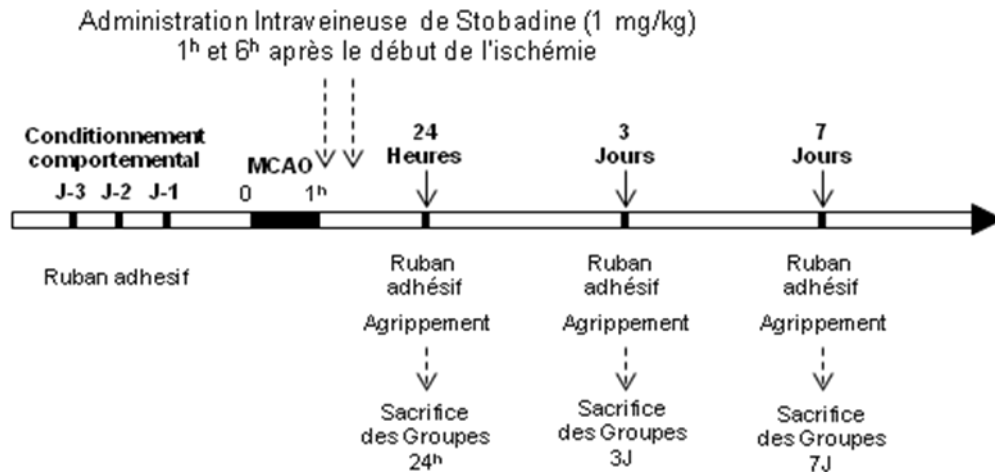
VII.C.2. Système d'évaluation

Cette échelle de score prend en compte le comportement de l'animal sur la barre ainsi que le temps de chute :

- Score 5 :** Le rat atteint une des barres verticales dans les 30 secondes.
- Score 4 :** Le rat reste accroché par les 4 pattes et la queue et se promène sur la tige quelque soit la direction pendant au moins 5 secondes.
- Score 3 :** Le rat reste accroché par les 4 pattes et la queue pendant au moins 5 secondes.
- Score 2 :** Le rat reste accroché par les 4 pattes pendant au moins 5 secondes.
- Score 1 :** Le rat reste accroché pendant 30 secondes sans utiliser simultanément les 4 pattes.
- Score 0 :** Le rat chute au cours de la période des 30 secondes.

VII.C.3. Synthèse chronologique des différents tests comportementaux utilisés en fonction du protocole pharmacologique expérimental

Le Protocole de la Stobadine ou son véhicule à 24h, 3 jours ou 7 jours après l'ischémie-reperfusion



Le Protocole du Fénofibrate ou son véhicule à 3 jours après l'ischémie-reperfusion

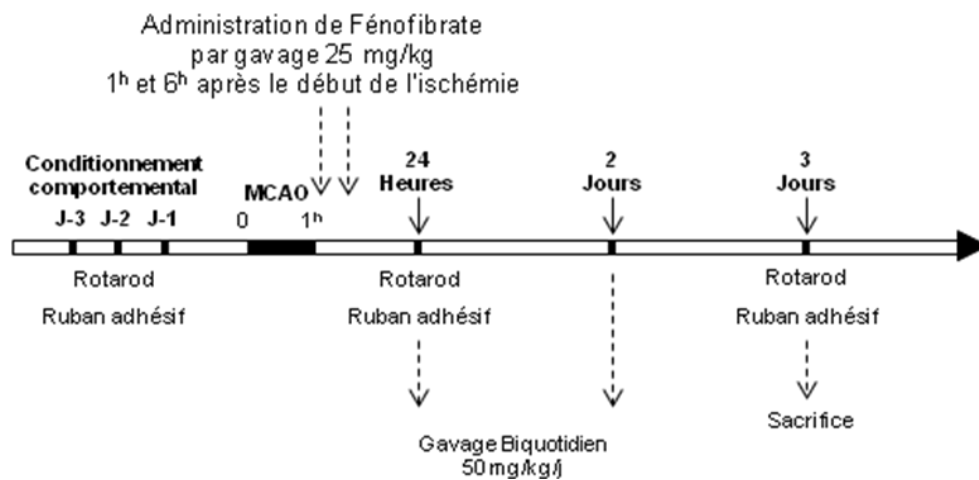


Figure 69: Figure récapitulative des différents tests comportementaux utilisés

VIII. Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés sous formes de moyennes affectées de l'erreur standard sur la moyenne. Les volumes d'infarctus, les densités de courant Kir2.x relevées à -135 mV, les valeurs de réactivité vasculaire et comportementales sont comparées en effectuant une analyse de variance ANOVA à un facteur suivi par un test de Fischer post-hoc Protected Least Significant Difference (PLSD). Les densités de courant Kv sont comparées par un test-t de Student. Pour l'ensemble de ces données, le niveau de significativité choisi est de $p < 0,05$.

Résultats

**I. Mise en place des altérations
cérébrovasculaires et comportementales à
la phase aiguë du processus d'ischémie
reperfusion (à 24 heures de reperfusion)**

I.A. Lésions cérébrales à 24 heures de reperfusion

Sur l'ensemble des protocoles utilisés dans ce travail, un groupe d'animaux est consacré à l'étude du véhicule à la fois en terme de quantification du volume de l'infarctus cérébral, mais aussi sur les analyses vasculaires en patch-clamp et en vasoréactivité ainsi qu'au niveau des tests comportementaux. L'histogramme présenté sur la **Figure 70**, montre que l'ischémie reperfusion induit la formation d'un infarctus qui affecte tant le niveau cortical que sous cortical avec la formation d'un œdème (**n=18**). Ces différents volumes restent de plus homogènes entre les véhicules utilisés et quelle que soit la zone cérébrale considérée. Ces résultats nous permettent d'observer une bonne reproductibilité du modèle d'ischémie-reperfusion utilisé et de pouvoir notamment comparer les effets des substances étudiées dans les différents traitements pharmacologiques.

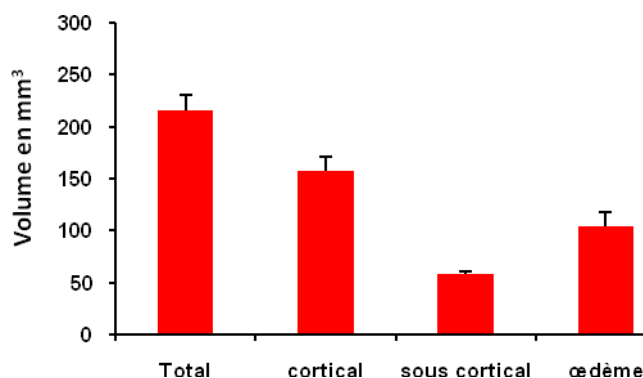


Figure 70: Volumes d'infarctus et d'œdème à 24 heures de reperfusion

I.B. Conséquences comportementales à 24 heures de reperfusion

Les différents tests comportementaux utilisés (test de la traction préhensile, test du rotarod et test du ruban adhésif) permettent d'évaluer d'une part les déficits moteurs et sensori-moteurs induits par l'ischémie reperfusion et d'autre part le bénéfice fonctionnel apporté par les deux protocoles pharmacologiques de la Stobadine et du Fénofibrate (**Figure 71**). On observe pour ces trois tests une diminution significative ($p < 0,05$) des performances réalisées par l'animal à 24 heures de reperfusion, comparées à celles du groupe sham correspondant qui ne montre pas de perte de performance.

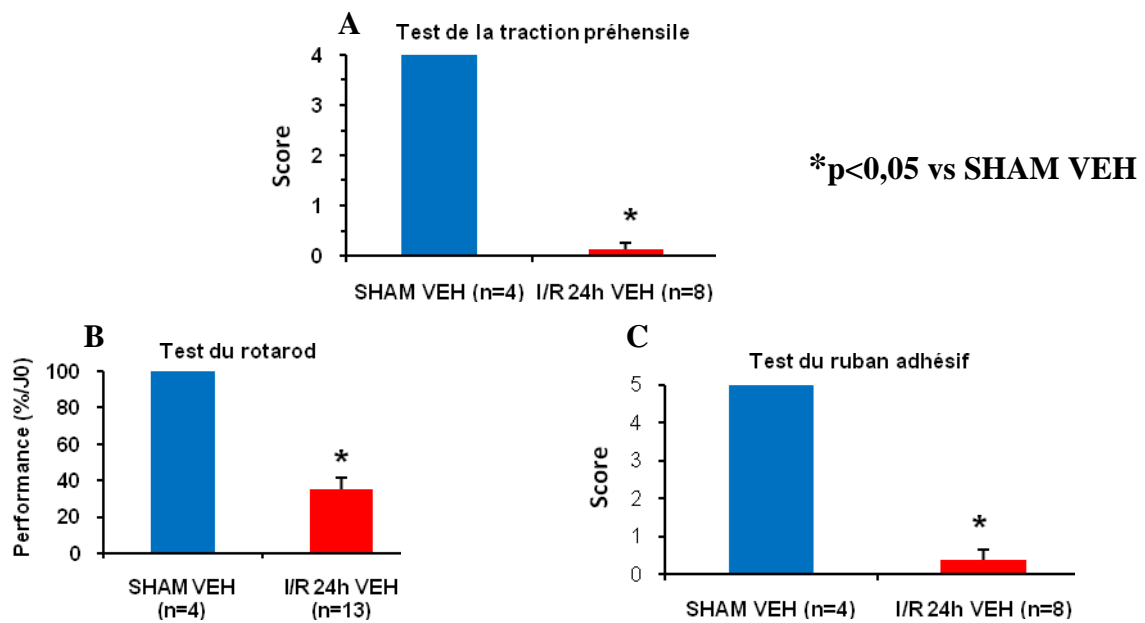


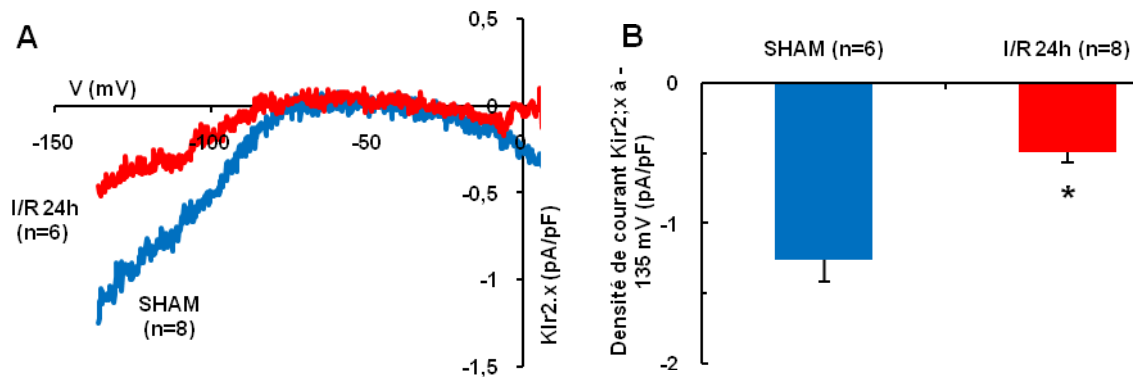
Figure 71: Altérations comportementales évaluées par les différents tests à 24 heures de reperfusion

A, B, C : Diminution des performances fonctionnelles à 24 heures de reperfusion pour les 3 tests comportementaux utilisés chez les animaux traités par le véhicule comparés aux animaux SHAM.

I.C. Altérations électrophysiologiques vasculaires à 24 heures de reperfusion

I.C.1. Densité de courant Kir2.x à 24 heures de reperfusion

Une forte altération du courant Kir2.x de la cellule musculaire lisse vasculaire est observée à 24 heures de reperfusion par rapport au groupe Sham (**Figure 72A**). Les densités de courant sont comparées au potentiel imposé de -135 mV, potentiel induisant dans ces conditions la densité de courant maximale. A 24 heures de reperfusion, la densité de courant Kir2.x est ainsi significativement diminuée ($p < 0.01$) avec une valeur de $-0,49 \pm 0,21$ pA/pF comparée à celle de $-1,22 \pm 0,47$ pA/pF du groupe Sham (**Figure 72B**).



* $p < 0,05$ vs Sham

Figure 72: Relation densité de courant Kir2.x - potentiel et valeur de la densité de courant Kir2.x à -135mV en condition I/R 24h et Sham

I.D. Densité de courant Kv et modulation par la voie du NO/GMPc/PKG à 24 heures de reperfusion

I.D.1. Caractérisation de la densité de courant Kv et de sa diminution suite à l'ischémie-reperfusion

Le courant Kv de la cellule musculaire lisse de l'artère cérébrale moyenne présente dans nos conditions d'enregistrement une activation vers -30 mV ainsi qu'une rectification sortante marquée dans les potentiels dépolarisés (**Figure 73A**).

Les densités de courant entre les différents groupes d'étude sont comparées au potentiel imposé de +40 mV, potentiels où les différentes altérations observées sont les plus significatives. A 24 heures de reperfusion, on observe une altération du courant Kv avec une diminution significative ($p < 0,05$) de la densité de courant dans la gamme de potentiel allant de -10 à +60 mV. A +40 mV, cette diminution est de 26,07 % (**Figure 73B**). Les enregistrements de 2 traces de courant Kv correspondant au saut de potentiel de -67 mV à +40 mV pour des capacités membranaires (C_m) similaires (non significativement différentes) réalisés en condition Sham et d'ischémie reperfusion à 24 heures sont présentés sur la **Figure 73C**. Ces deux traces, obtenues par la soustraction de celles réalisées avant et après le blocage par la 4-aminopyridine (3 mM), illustrent la diminution du courant effective entre ces deux groupes de cellules au potentiel imposé de +40 mV pour une valeur de capacité membranaire similaire (19,35 pF pour la cellule Sham et 19,58 pF pour la cellule I/R 24h).

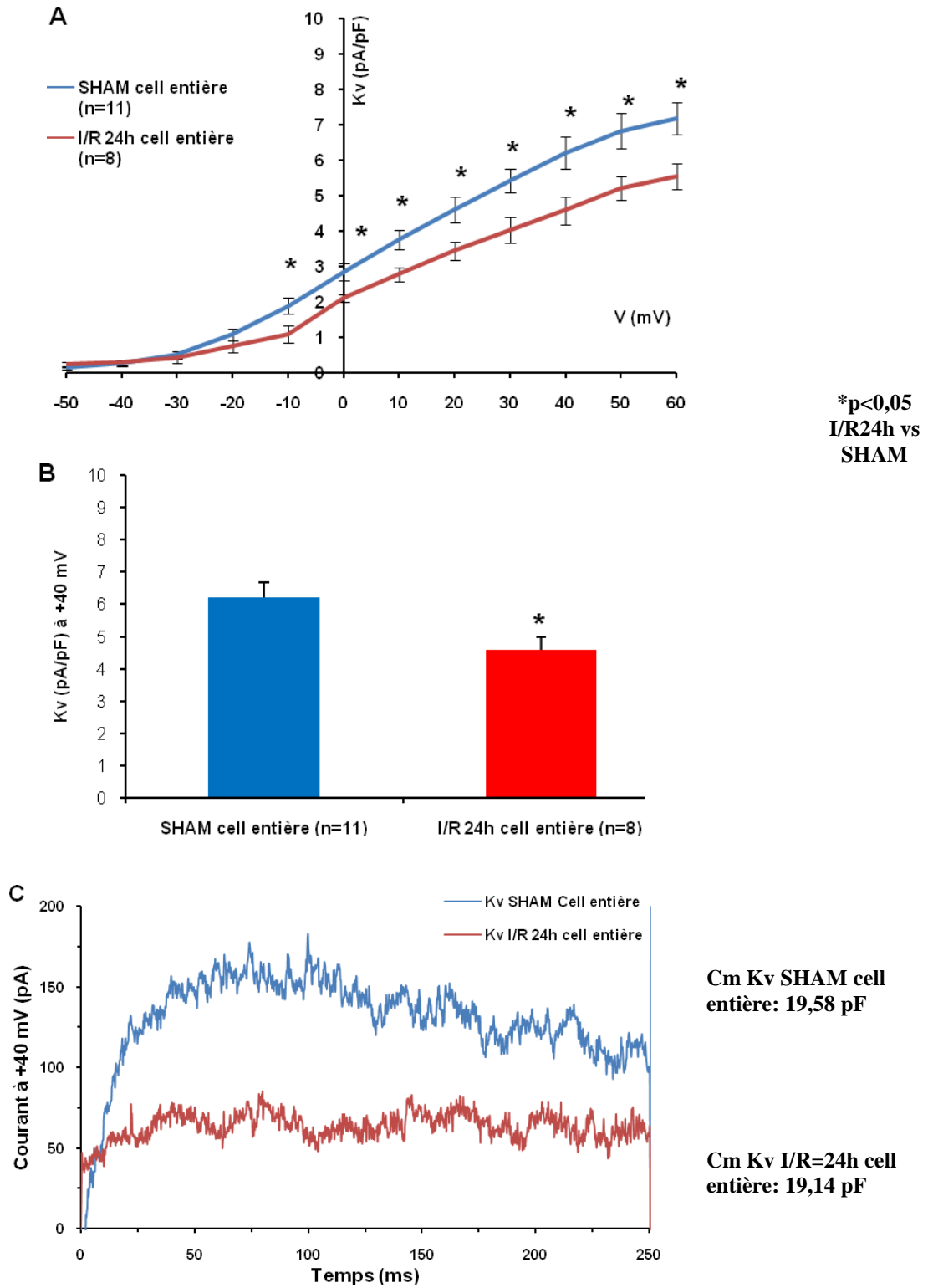


Figure 73: Caractérisation du courant Kv de la cellule musculaire lisse et de son altération à 24 heures de reperfusion en configuration cellule entière

A : Courbes de densités de courant Kv en fonction du potentiel obtenues sur des myocytes d'animaux SHAM ou I/R. **B** : Densités de courant Kv au potentiel de +40 mV sur des myocytes d'animaux SHAM ou I/R. **C** : Tracés représentatifs du courant Kv à un potentiel de +40 mV en fonction du temps enregistrés sur des myocytes issus d'animaux SHAM ou I/R.

I.D.2. Mise en évidence d'une régulation spécifique du courant Kv par le NO sur des cellules ischémisées-reperfusées

I.D.2.a. Effets du DEANONOate en conditions sham

La régulation du courant Kv par le NO est testée par l'application de DEA-NONOate dans le milieu extracellulaire en configuration cellule entière à deux concentrations croissantes : 10 μM et 100 μM . Aucun effet significatif n'est observable dans ces conditions par rapport au groupe sham, les 3 courbes étant parfaitement superposées (**Figure 74A**). Ceci est confirmé par l'histogramme de la **Figure 74B** où les valeurs de densité de courant à +40 mV sont similaires dans les mêmes conditions.

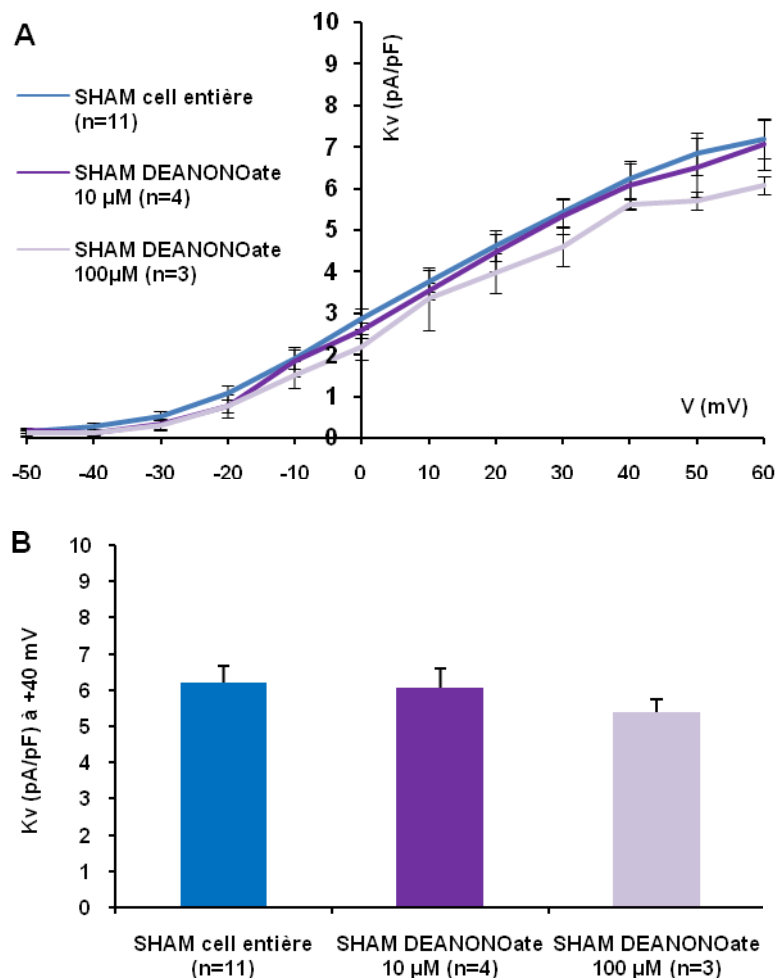


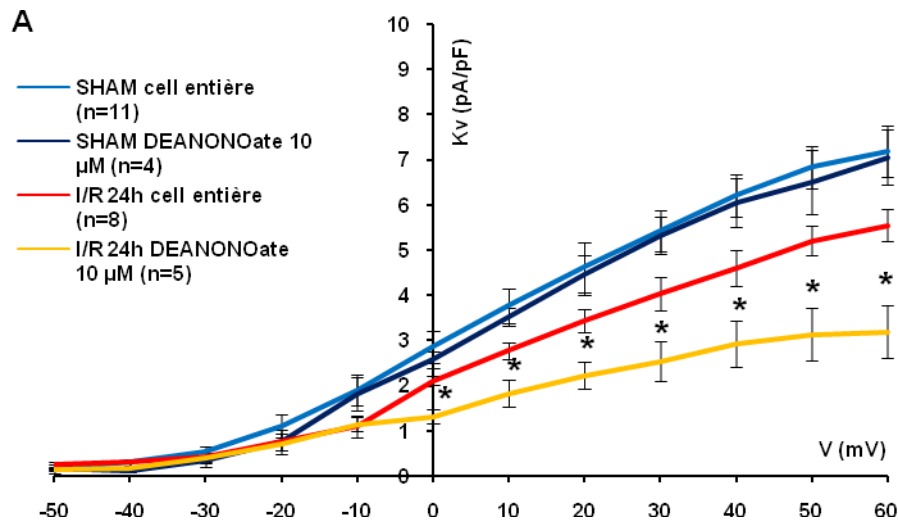
Figure 74: Evaluation d'une régulation du courant Kv par le NO par l'application de DEA-NONOate

A : Courbes densités de courant Kv en fonction du potentiel obtenues sur des myocytes d'animaux SHAM en condition contrôle et en présence de DEANONOate à 10 μM et 100 μM . **B** : Densités de courant Kv à +40 mV en absence et en présence de 10 μM et 100 μM de DEANONOate sur des myocytes issus d'animaux SHAM

I.D.2.b. Effets du DEANONOate en condition d'ischémie-reperfusion

En revanche, l'application de DEA-NONOate à 10 μM sur les cellules issues d'animaux ischémisés reperfusés pendant 24 heures induit une potentialisation significative ($p < 0,05$) de l'altération de la densité de courant Kv à 24 heures dans les mêmes conditions

d'enregistrement (**Figure 75A**). Cette diminution à +40 mV est de 52,8 % par rapport au groupe témoin et de 36,2 % par rapport au groupe I/R 24 heures en absence de DEANONOate. Elle est significative ($p < 0,05$) dans la gamme de potentiel allant de 0 mV à +60 mV (**Figure 75B**).



* $p < 0,05$ vs SHAM DEANONOate 10 μ M et I/R 24h cell entière

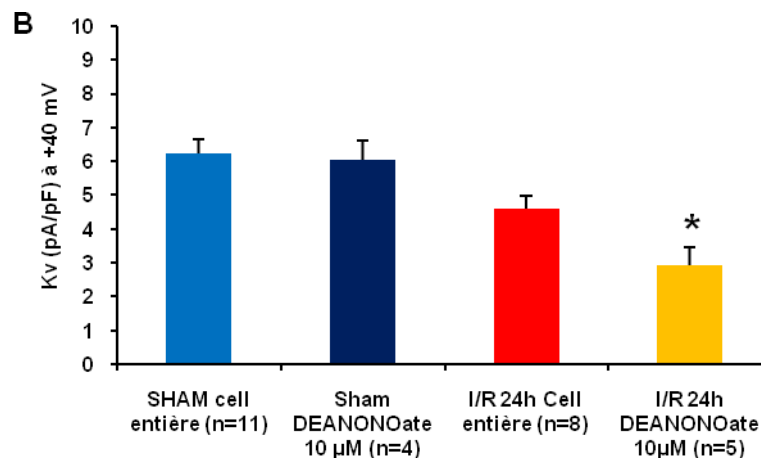


Figure 75: Potentialisation de l'altération du courant Kv par un donneur de NO en conditions d'ischémie-reperfusion 24h

A : Courbes de densités de courant Kv en fonction du potentiel obtenues sur des myocytes d'animaux SHAM et I/R en condition contrôle et en présence de DEANONOate à 10 μ M. **B** : Densités de courant Kv à +40 mV en absence et en présence de 10 μ M de DEANONOate sur des myocytes issus d'animaux SHAM et I/R.

I.D.3. Mise en évidence de l'implication délétère de la voie NO/GMPc/PKG sur les cellules ischémiées-reperfusées

L'observation précédente nous a alors conduits à tester l'effet de modulateurs de la voie NO/GMPc/PKG de la cellule musculaire lisse sur la densité de courant Kv. L'application dans le milieu extracellulaire de 8-BrGMPc, analogue perméant et moins

hydrolysable du GMPc, et de T-1032, inhibiteur de la phosphodiesterase 5 spécifique de la dégradation du GMPc dans la cellule musculaire lisse, permet par l'augmentation de la concentration intracellulaire en GMPc d'activer cette voie et d'évaluer les effets sur la densité de courant Kv. A l'opposé, l'application d'ODQ (10 μ M), inhibiteur de la guanylate cyclase soluble (GCs) source de GMPc, dans le milieu extracellulaire est utilisée dans le but de bloquer l'influence supposée négative à 24 heures de reperfusion de cette voie sur la densité de courant Kv en diminuant la concentration intracellulaire en GMPc (**Figure 76**).

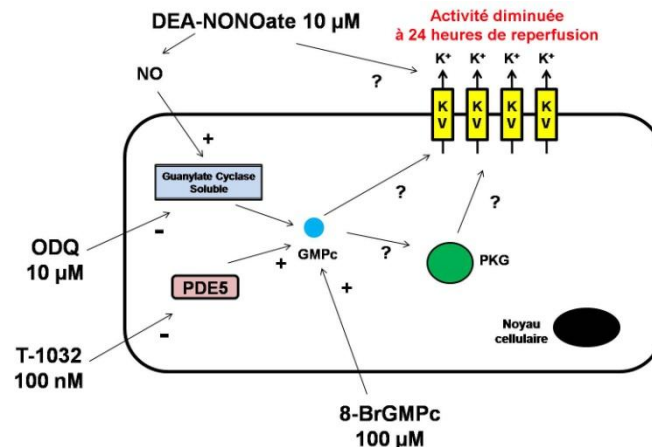


Figure 76: Action des modulateurs utilisés de la voie NO/GMPc/PKG sur la densité de courant Kv de la cellule musculaire lisse

I.D.3.a. En augmentant la concentration intracellulaire en GMPc

Nous avons vérifié qu'une solution extracellulaire contenant au final moins de 0,050% de DMSO (véhicule du T-1032 et de l'ODQ) n'a aucun effet significatif sur l'activité de canaux potassiques au cours de l'enregistrement. L'application de 8-BrGMPc (100 μ M) et de T-1032 (100 nM) sur les cellules Sham en configuration cellule entière n'induit aucun effet significatif sur la densité de courant Kv (**Figure 77**).

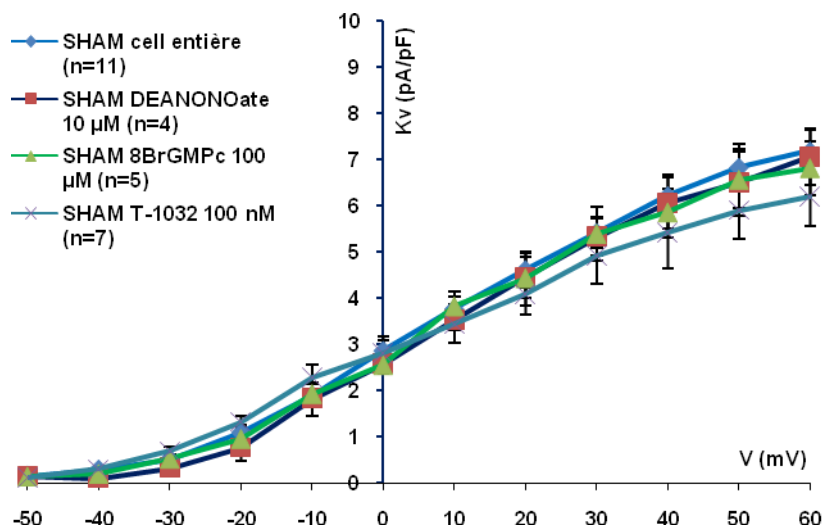
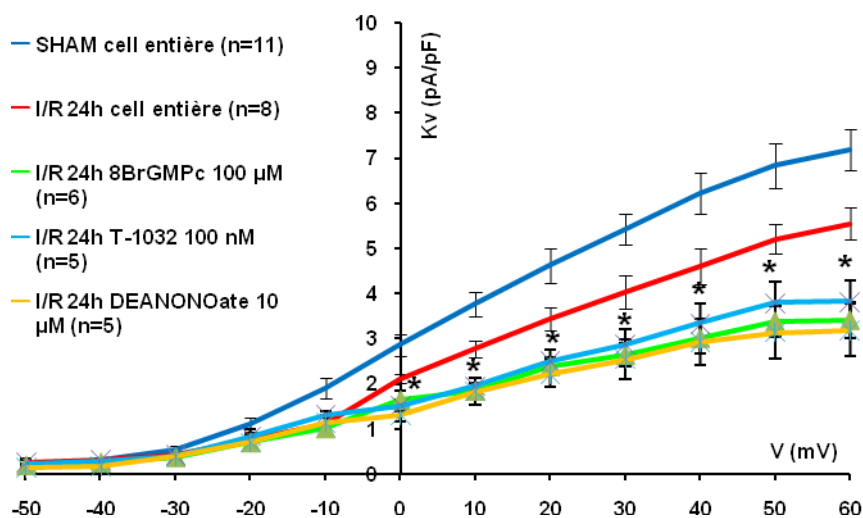


Figure 77: Effets des modulateurs de la voie NO/GMPc/PKG en condition Sham

Courbes de densités de courant Kv en fonction du potentiel mesurées sur des myocytes issus d'animaux SHAM en condition contrôle et en présence de 10 µM de DEANONOate, de 100µM de 8BrGMPc et de 100 nM de T-1032.

Après 24 heures d'ischémie reperfusion, une potentialisation de l'altération post-ischémique est observée suite à l'application du 8-BrGMPc et du T-1032 sur les cellules issues d'animaux ischémiés reperfusés 24 heures (**Figure 78**) en configuration cellule entière, similaire à celle engendrée par le DEANONOate.



***p<0,05 vs I/R=24h cell entière**

Figure 78: Evaluation de l'implication délétère de la voie NO/GMPc/PKG de la cellule musculaire lisse sur la densité de courant Kv à 24 heures de reperfusion

Courbes de densités de courant Kv en fonction du potentiel mesurées sur des myocytes issus d'animaux SHAM et I/R en condition contrôle et en présence de 10 µM de DEANONOate, de 100 µM de 8-BrGMPc et de 100 nM de T-1032.

Cette potentialisation de l'altération par le 8-BrGMPc et le T-1032 est significative ($p < 0,05$) dans la gamme de potentiel allant de 0 mV à +60 mV et diminue respectivement la densité de courant Kv à +40 mV de 51,6 % par rapport au groupe Sham correspondant et de 34,2 % par rapport au groupe I/R 24h pour le groupe 8-BrGMPc et de 46,4 % par rapport au groupe Sham et 27,5 % par rapport au groupe I/R 24h pour le groupe T-1032 (**Figure 79**).

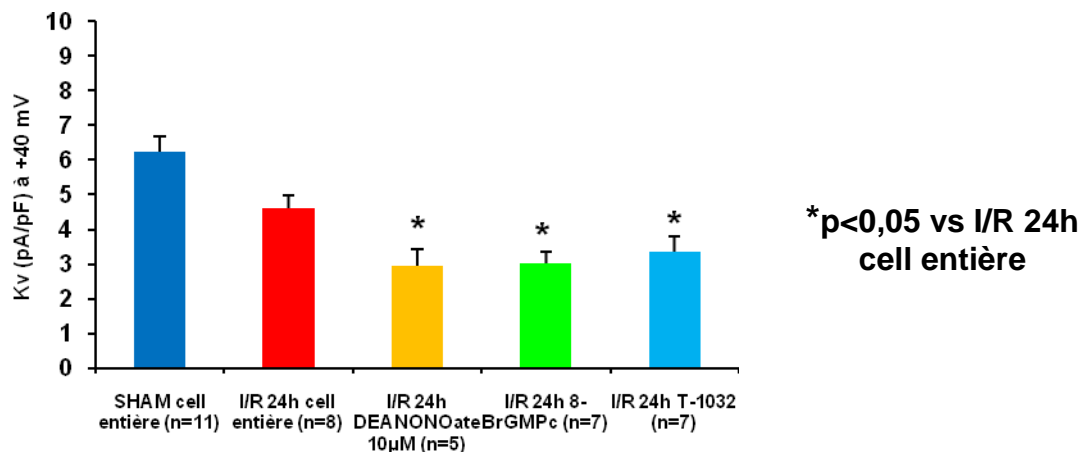


Figure 79: Densité de courant Kv à +40 mV suite à l'application de modulateurs de la voie NO/GMPc/PKG à 24 heures de reperfusion

I.D.3.b. En configuration patch perforé

La configuration patch perforé est ici utilisée pour évaluer l'importance de l'environnement intracellulaire du canal sur son activité dans les conditions sham et d'ischémie reperfusion. Le courant Kv présente la même propriété de rectification sortante que celle enregistrée en configuration cellule entière (**Figure 80A**). Aucune différence significative n'est observée sur la densité de courant en condition sham enregistrée en configuration cellule entière et patch perforé. En revanche, une diminution significative de la densité de courant dans la gamme de potentiel allant de -10 mV à +60 mV est observée à 24 heures de reperfusion. Cette altération à +40 mV se trouve ici majorée par rapport à celle observée en configuration cellule entière avec une diminution significative de 53,69 % ($p < 0,05$) (**Figure 80B**), supposant que l'altération observée à 24 heures de reperfusion est supérieure lorsque l'intégrité du milieu intracellulaire est préservée au cours de l'enregistrement.

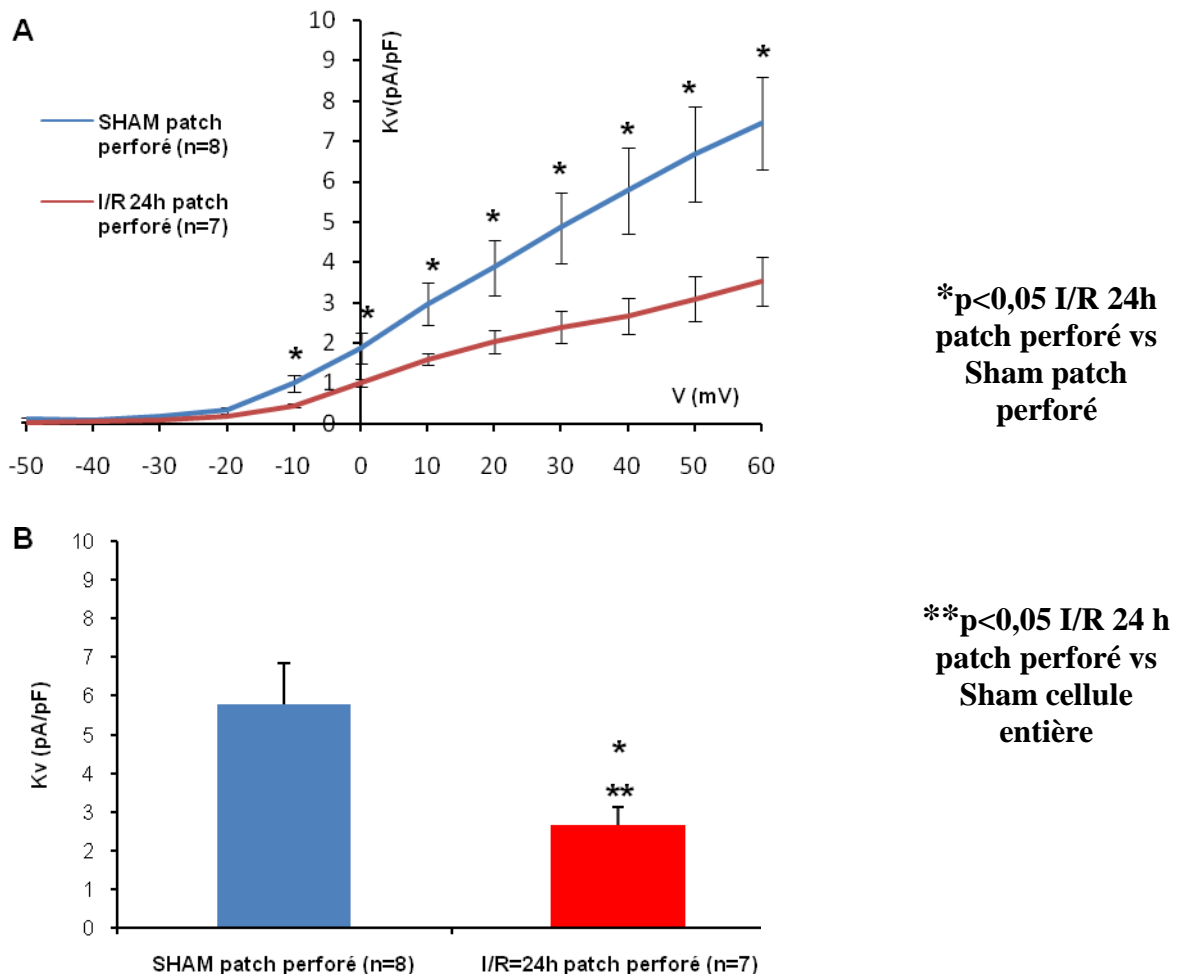


Figure 80: Caractérisation du courant Kv de la cellule musculaire lisse et de son altération à 24 heures de reperfusion en configuration patch-perforé

A : Courbes de densités de courant Kv en fonction du potentiel en configuration patch perforé sur des myocytes issus d'animaux SHAM ou I/R. **B** : Densités moyennes de courant Kv au potentiel de +40 mV obtenues sur des myocytes issus d'animaux SHAM ou I/R.

I.D.3.c. En diminuant la concentration intracellulaire en GMPc

L'application de l'ODQ, inhibiteur de la guanylate cyclase soluble, sur les cellules Sham en configuration patch perforé ne provoque aucune modification significative de la densité de courant Kv en condition sham. Mesurées à +40 mV, les valeurs de densité de courant sont en effet similaires après action de l'ODQ (**Figure 81A**). En revanche, la réalisation des mêmes enregistrements en condition d'ischémie-reperfusion 24 heures montre une restauration significative ($p < 0,05$) de la densité de courant Kv dans la gamme de potentiel qui s'étend de -10 mV à +60 mV (**Figure 81B**).

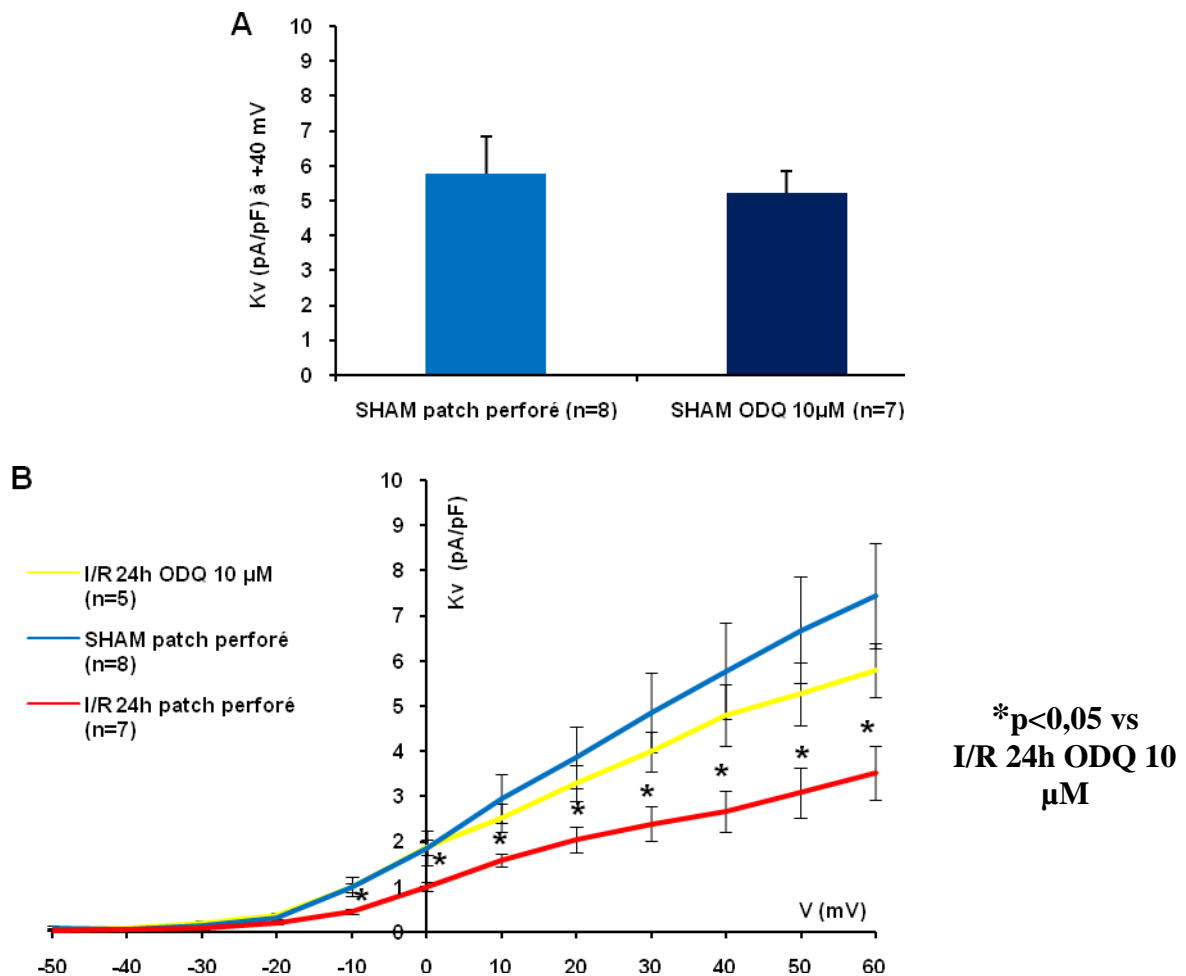
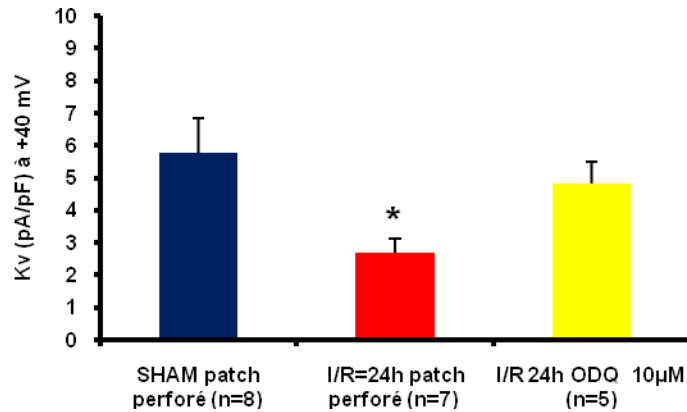


Figure 81: Restauration de la densité de courant Kv suite à l'application d'ODQ sur les cellules ischémiées reperfusées 24 heures

A : Densité moyennes de courant Kv au potentiel de +40 mV obtenues sur des myocytes issus d'animaux SHAM ou I/R, en configuration patch perforé, en absence et en présence de 10 µM d'ODQ. **B** : Courbes de densités de courant Kv en fonction du potentiel en configuration patch perforé sur des myocytes issus d'animaux SHAM ou I/R en absence ou en présence de 10 µM d'ODQ.

Ce retour à des valeurs de densité de courant proche de celles mesurées sur des cellules sham est ainsi illustrée au potentiel imposé de +40 mV sur la **Figure 82**.



*p<0,05 vs I/R=24h ODQ 10 µM

Figure 82: Restauration de la densité de courant Kv illustrée à +40mV suite à l'application d'ODQ sur les cellules ischémisées reperfusées 24 heures

Densités de courant Kv au potentiel de +40 mV mesurées sur des myocytes issus d'animaux SHAM et I/R en configuration patch perforé en condition contrôle et en présence d'ODQ.

I.E. Relaxation musculaire lisse potassium-dépendante sensible au baryum à 24 heures de reperfusion

La relaxation musculaire lisse potassium-dépendante sensible au baryum, observée après l'application de 15 mM de KCl activant les canaux potassiques Kir2.x, se trouve significativement (p<0,05) réduite à 24 heures de reperfusion (16,39 ± 4,29 % de relaxation) comparée à celle du groupe Sham correspondant (34,30 ± 5,49 % de relaxation) (Figure 83).

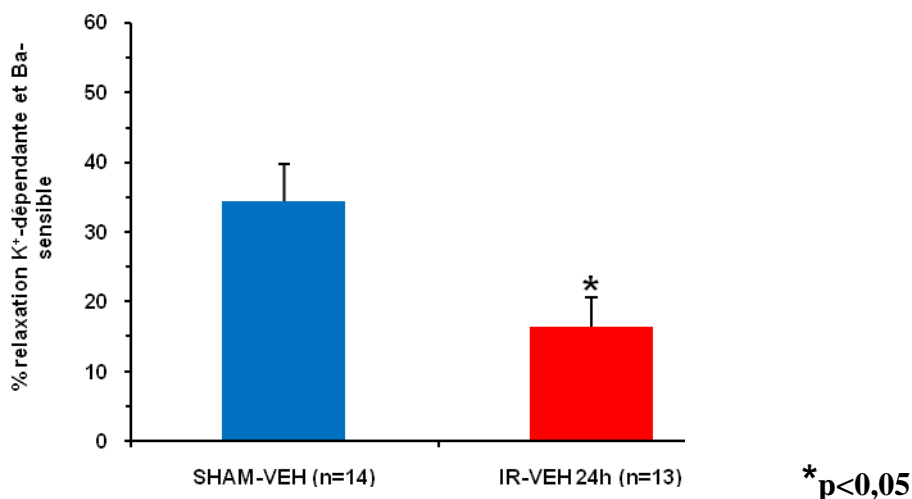


Figure 83: Représentation de la relaxation musculaire lisse induite par 15 mM KCl à 24 heures de reperfusion

I.F. Relaxation endothélium-dépendante à 24 heures de reperfusion

Une diminution significative (p<0,05) de la relaxation endothélium-dépendante en réponse à l'acétylcholine (3.10⁻⁵M) est observée après 24 heures de reperfusion (12,31 ± 1,42

%) comparée à l'augmentation de diamètre mesurée sur des artères sham ($23,74 \pm 2,19$ %) (Figure 84).

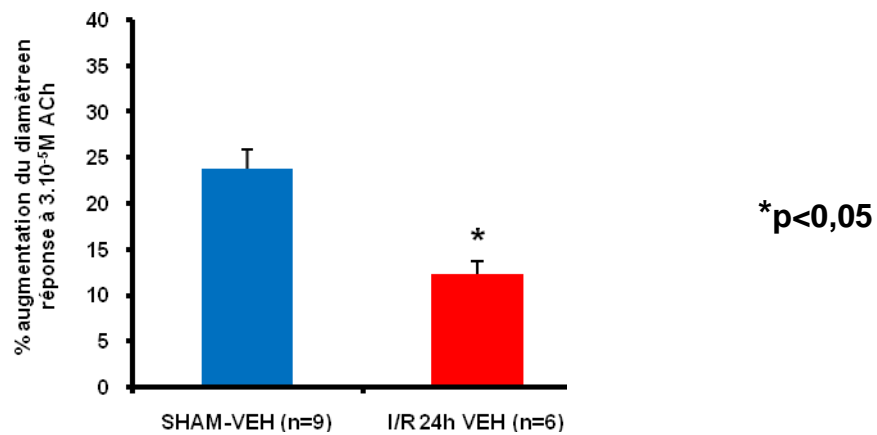


Figure 84: Relaxation endothélium-dépendante à 24 heures de reperfusion

I.G. Propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne à 24 heures de reperfusion

I.G.1. Le tonus myogénique à 24 heures de reperfusion

Une altération significative ($p < 0,05$) du tonus myogénique de l'artère cérébrale moyenne, observée en réponse à l'augmentation par palier de la pression intraluminale, est constatée suite à 24 heures de reperfusion (Figure 85). En conditions sham, l'artère développe en effet spontanément un pourcentage de contraction de $28,1 \pm 1,9$ % à 75 mm Hg qui, à l'issue de l'ischémie suivie 24 heures de reperfusion n'est que de $17,2 \pm 1,93$ % de contraction.

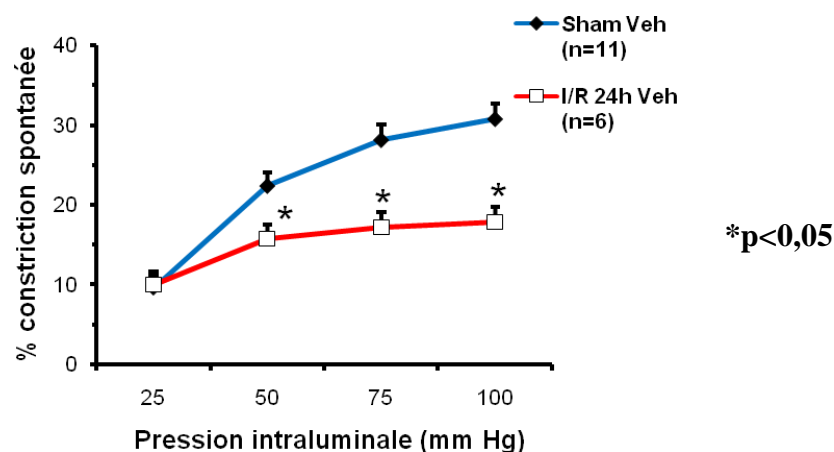


Figure 85: Altération du tonus myogénique à 24 heures de reperfusion

Evolution du tonus myogénique en réponse à une augmentation de la pression intraluminale, à 24 heures de reperfusion sur les artères cérébrales moyennes issues d'animaux SHAM et I/R traités par le véhicule.

I.G.2. Les autres propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne à 24 heures de reperfusion

On observe à 24 heures de reperfusion une altération significative de la fonction contractile du muscle lisse évaluée par l'application de sérotonine. Le diamètre de l'artère cérébrale moyenne est significativement augmenté passant d'une valeur de $172,58 \pm 9,84 \mu\text{m}$ en condition sham à $198 \pm 6,78 \mu\text{m}$ en condition d'ischémie/reperfusion 24 heures (**Tableau 3**). Seule, la relaxation indépendante de l'endothélium induite par l'application de SNP reste inchangée à 24 heures de reperfusion.

Groupes	Sham-Veh	I/R 24h Veh
Contraction en réponse à la sérotonine (%)	$47,46 \pm 2,76$ (n=5)	$33,26 \pm 2,45$ ** (n=6)
Diamètre au repos (μm)	$172,58 \pm 9,84$ (n=12)	$198,00 \pm 6,78$ * (n=7)
Relaxation en réponse au SNP (%)	$123,21 \pm 14,40$ (n=11)	$125,81 \pm 10,53$ (n=13)
*p<0,05 I/R 24h Veh vs Sham Veh **p<0,005 I/R 24h Veh vs Sham Veh		

Tableau 3: Propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne à 24 heures de reperfusion

**II. Évolution spontanée des lésions
cérébrovasculaires de la période aiguë à la
période subaiguë du processus d'ischémie
reperfusion (24 heures, 3 jours, 7 jours)**

II.A. Evolution des lésions cérébrales au cours du temps

A 3 jours de reperfusion, une augmentation transitoire, proche de la significativité, des volumes d'infarctus total et cortical est à noter (**Figure 86**). En revanche à 7 jours de reperfusion, une diminution significative ($p < 0,005$) des volumes d'infarctus sous cortical et de l'œdème s'établit spontanément.

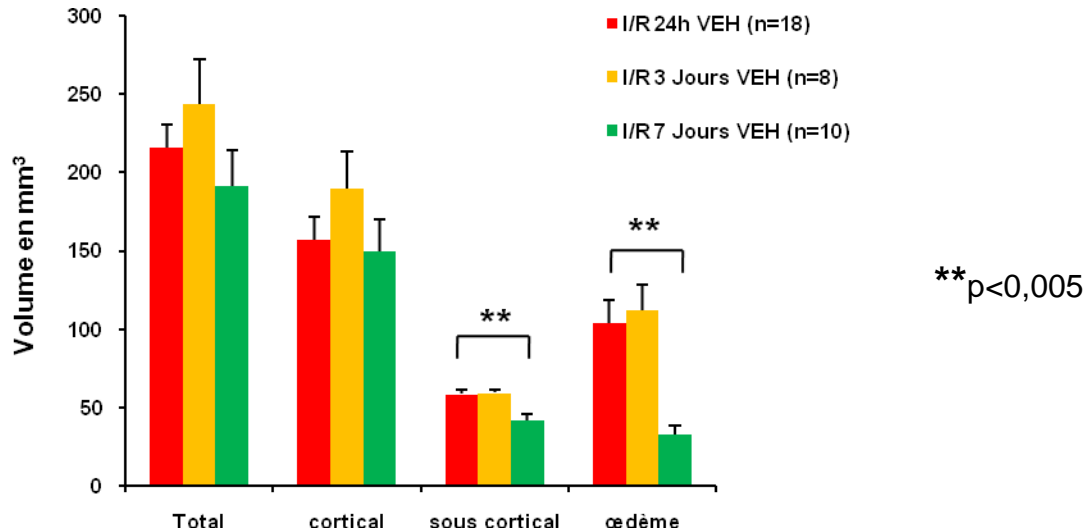


Figure 86: Evolution au cours du temps des volumes d'infarctus et de l'œdème à 24h, 3 et 7 jours de reperfusion suite à la MCAO

II.B. Evolution de la récupération sensori-motrice au cours du temps

II.B.1. Test du ruban adhésif

Les performances des animaux sham au test du ruban adhésif ne montrent aucune différence avant et après l'opération blanche et correspondent au score maximal déterminé (score 5) représentant l'aptitude de l'animal à retirer les deux morceaux de ruban adhésif en moins de 10 secondes. A 24 heures de reperfusion, les animaux traités par le véhicule montrent une aptitude significativement altérée à réaliser ce test avec un score très faible (**Figure 87**).

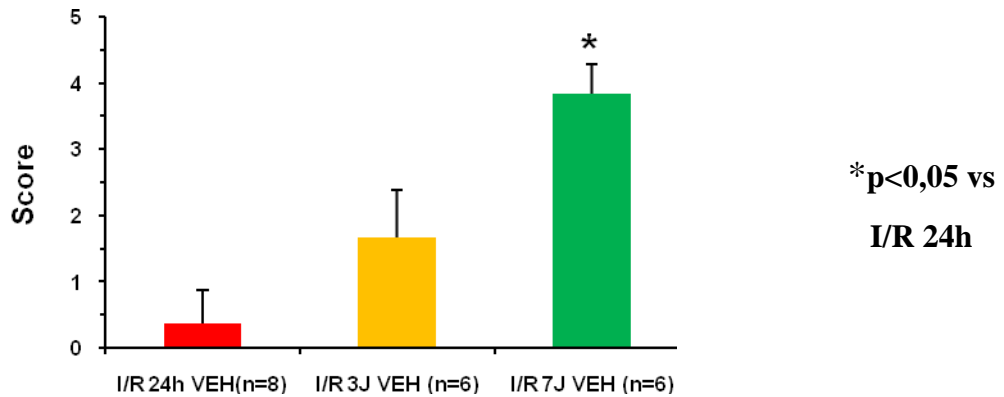


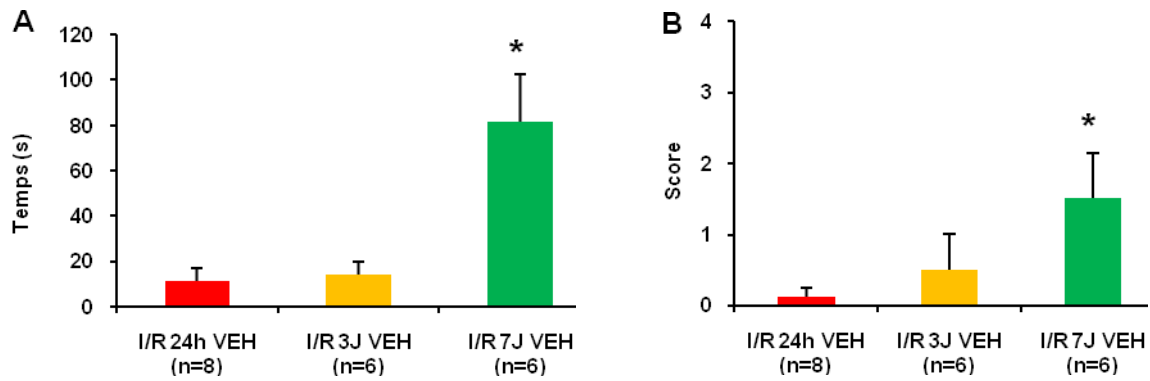
Figure 87: Test du ruban adhésif au cours de la période d'étude

Évolution des performances fonctionnelles à 24 heures, 3 jours et 7 jours de reperfusion pour le test du ruban adhésif chez les animaux traités par le véhicule.

Au cours de la période subaiguë, il y a une récupération progressive et spontanée de la fonction sensori-motrice. Celle-ci est significative ($p < 0,05$) à 7 jours de reperfusion, même si cette récupération n'est pas totale dans la mesure où ce score n'atteint pas ses valeurs antérieures à l'ischémie-reperfusion pendant la période d'étude.

II.B.2. Test de l'agrippement (la traction préhensile)

Ce test n'est réalisé qu'une seule fois après la réalisation de l'ischémie reperfusion sur les animaux. A 24 heures et 3 jours de reperfusion, les animaux affichent des performances très faibles reflétant leur atteinte motrice post-ischémique par le faible temps restant agrippé sur la barre (**Figure 88A**). Une période de 7 jours est nécessaire pour observer une récupération fonctionnelle significative ($p < 0,05$).



* $p < 0,05$ vs I/R 24h VEH

Figure 88: Test de la préhension tractile au cours de la période d'étude

Évolution des performances fonctionnelles à 24 heures, 3 jours et 7 jours de reperfusion pour le test de la traction préhensile chez les animaux traités par le véhicule.

Le même schéma de récupération est observé lorsque les performances de l'animal sont reportées selon le système de score qui permet une meilleure évaluation du comportement de l'animal sur la barre (**Figure 88B**). Il est à noter que là aussi le score maximal de 5, réalisé par des animaux Sham, n'est jamais atteint pendant la période d'étude par les animaux ayant subi une ischémie reperfusion.

II.B.3 Test du rotarod à 24 heures et 3 jours de reperfusion

Le test du rotarod permet d'évaluer le déficit moteur induit par l'ischémie reperfusion par la capacité des animaux à s'adapter à la vitesse croissante du cylindre. On observe suite à 24 heures de reperfusion, une perte significative de leurs performances par rapport à celles réalisées antérieurement à l'opération (J0), reflétée par la diminution significative en pourcentage du temps passé sur le rotarod lorsque celle-ci est comparée aux valeurs du groupe sham correspondant (**Figure 89**). On note une tendance à la récupération à 3 jours de reperfusion, sans toutefois être significative.

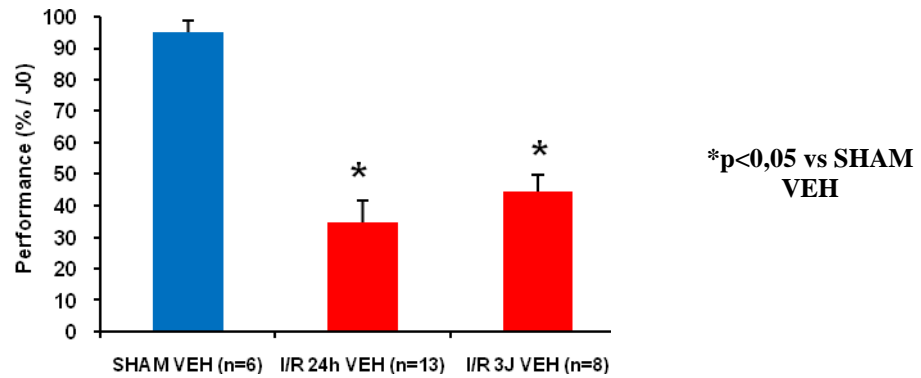


Figure 89: Test du rotarod à 24 heures et 3 jours de reperfusion

Évolution des performances fonctionnelles à 24 heures et 3 jours de reperfusion pour le test du rotarod chez les animaux traités par le véhicule comparés aux animaux SHAM.

II.C. Évolution de la densité de courant Kir2.x au cours du temps

La densité de courant Kir2.x de la cellule musculaire lisse vasculaire altérée à 24h de reperfusion récupère spontanément et progressivement de façon significative dès 3 jours de reperfusion ($p < 0,05$) (**Figure 90A**). Une récupération totale du courant est observée à 7 jours de reperfusion, les densités de courant des groupes I/R 7 jours et Sham n'étant pas significativement différentes (**Figure 90B**). Toutes les valeurs de densités de courant sham ont été rassemblées quelque soit la période de reperfusion, leur valeur étant similaire les unes aux autres.

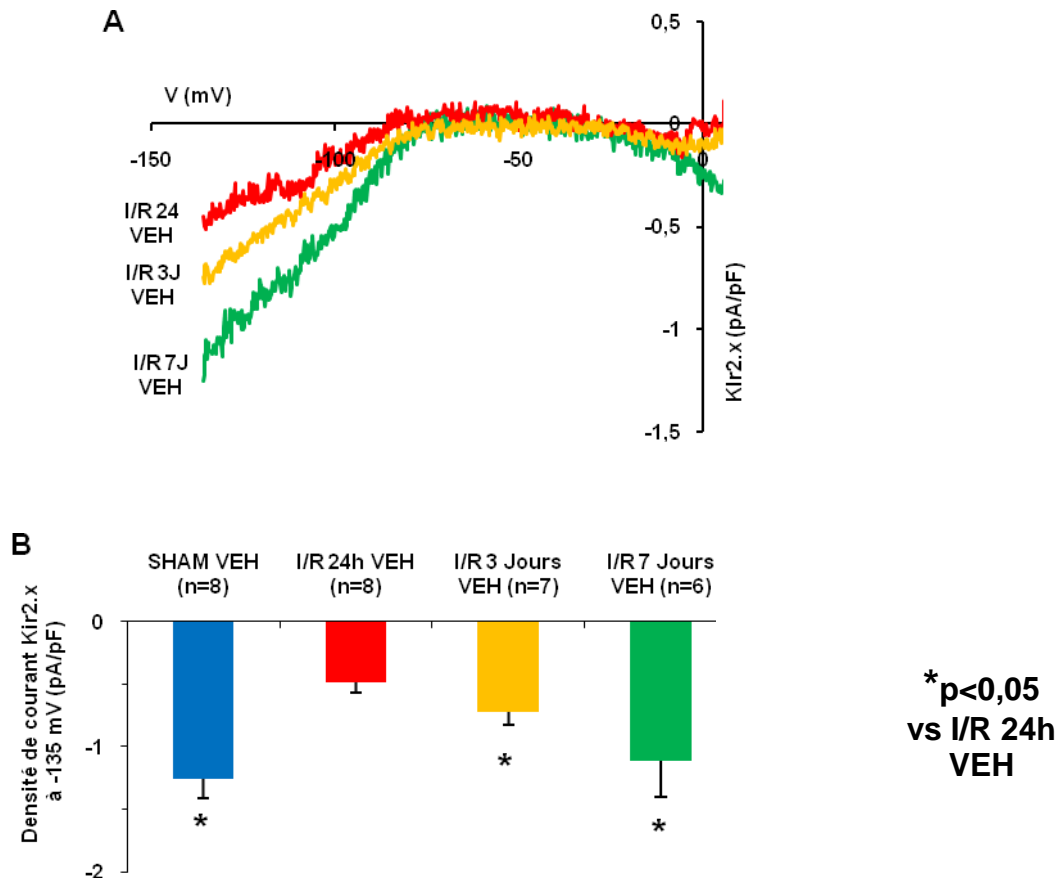
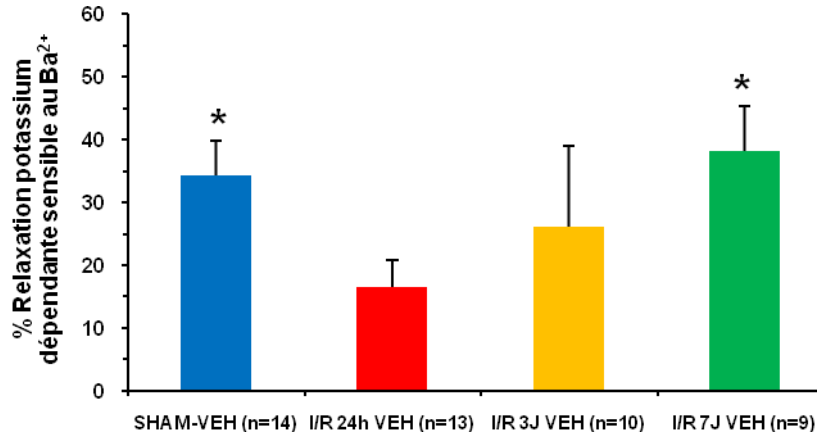


Figure 90: Récupération progressive de la densité de courant Kir2.x à 7 jours de reperfusion

A : Courbes de densité de courant Kir2.x en fonction du potentiel obtenues sur des myocytes issus d'animaux I/R à 24 heures, 3 jours et 7 jours de reperfusion. **B** : Densités de courant Kir2.x au potentiel de -135 mV sur des myocytes issus d'animaux SHAM et I/R.

II.D. Evolution de la Relaxation potassium-dépendante sensible au baryum au cours du temps

De façon concomitante à l'évolution de la densité de courant Kir2.x est observée une récupération spontanée et progressive de la relaxation potassium-dépendante au cours du temps (**Figure 91**). Celle-ci est partielle à 3 jours puis totale à 7 jours de reperfusion ($38,15 \pm 7,04$ % de relaxation) lorsqu'elle est alors comparée au groupe Sham ($34,30 \pm 5,49$ % de relaxation).

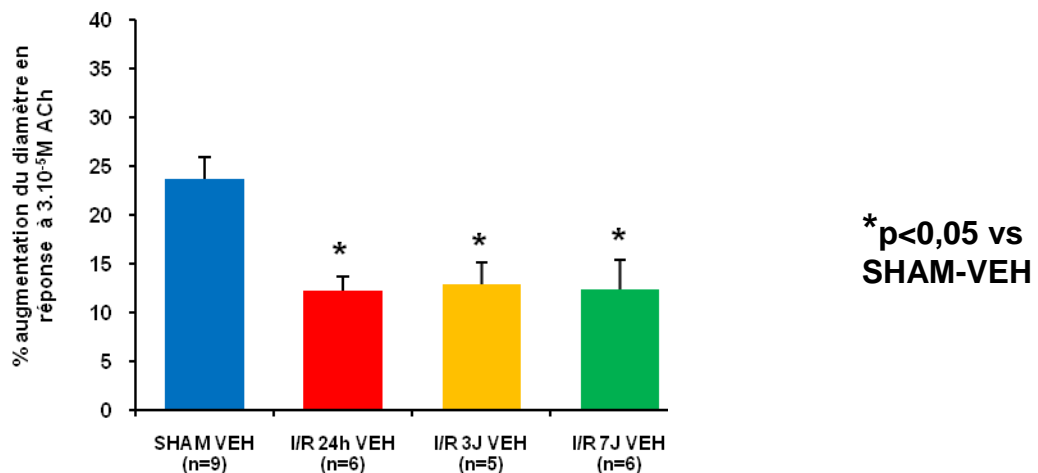


*p<0,05 vs I/R 24h

Figure 91: Récupération de la relaxation musculaire lisse induite par 15 mM KCl au cours du temps

II.E. Evolution de la relaxation endothélium-dépendante au cours du temps

La dysfonction post-ischémique à 24 heures de reperfusion de la relaxation endothéliale en réponse à l'acétylcholine ne présente pas de récupération fonctionnelle au cours du temps (Figure 92). On observe en effet une persistance de l'altération à 3 jours et 7 jours de reperfusion.



*p<0,05 vs SHAM-VEH

Figure 92: Evolution de la relaxation endothélium-dépendante au cours du temps

II.F. Évolution des propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne au cours du temps

II.F.1. Evolution du tonus myogénique au cours du temps

Suite à l'altération du tonus myogénique à 24 heures de reperfusion, le muscle lisse récupère totalement son potentiel de contraction spontanée en réponse à l'augmentation de la pression intraluminaire 7 jours après l'ischémie-reperfusion. La réponse est alors similaire à celle d'une artère cérébrale moyenne du groupe sham Véhicule correspondant

(Figure 93). Toutes les valeurs obtenues sur les artères issues d'animaux sham ont été rassemblées quelque soit la période de reperfusion, leur valeur étant similaire les unes entre les autres.

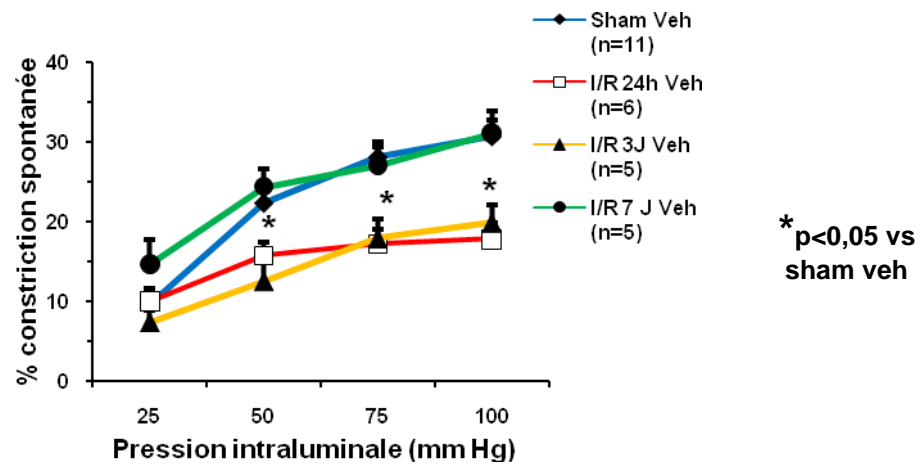


Figure 93: Récupération de la réponse contractile spontanée du muscle lisse au cours du temps

Evolution du tonus myogénique en réponse à une augmentation de la pression intraluminale, à 24 heures, 3 jours et 7 jours de reperfusion sur les artères cérébrales moyennes issues d'animaux SHAM et I/R traités par le véhicule.

II.F.2 Evolution des propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne au cours du temps

Seule la réponse contractile du muscle lisse se restaure progressivement suite à l'application de sérotonine (10^{-6} M) pendant la période d'étude qui s'étend jusqu'à 7 jours de reperfusion (Tableau 4). Aucune différence significative n'étant alors observée lorsqu'elle est comparée au groupe sham correspondant. Cependant, le diamètre de l'artère cérébrale moyenne au repos reflétant le tonus basal ne retrouve pas ses caractéristiques initiales même à 7 jours de reperfusion.

Groupes	Sham-Veh	I/R-Veh		
		24 heures	3 Jours	7 Jours
Contraction en réponse à la sérotonine (%)	47,46 ± 2,76 (n=5)	33,26 ± 2,45** (n=6)	32,85 ± 2,40** (n=5)	44,45 ± 5,63 (n=5)
Diamètre de repos (µm)	172,58 ± 9,84 (n=12)	198,00 ± 6,78* (n=7)	224,40 ± 8,93** (n=5)	202,33 ± 8,19* (n=6)
Relaxation en réponse au SNP (%)	123,21 ± 14,40 (n=11)	125,81 ± 10,53 (n=13)	125,74 ± 13,31 (n=9)	144,98 ± 19,56 (n=9)

*p<0,05 I/R-Veh vs Sham-Veh **p<0,005 I/R-Veh vs Sham-Veh

Tableau 4: Evolution des propriétés actives au cours du temps

**III. Approches pharmacologiques
neuroprotectrices (la Stobadine et le
Fénofibrate)**

III.A. La stobadine

III.A.1 Effet de la Stobadine sur les lésions cérébrales

Le traitement à la phase aiguë de l'ischémie reperfusion par la stobadine prévient la tendance à l'augmentation des volumes d'infarctus total et cortical qui survient de façon spontanée à 3 jours de reperfusion chez les animaux non traités. L'ensemble des volumes d'infarctus et d'œdème sont globalement plus faibles chez les animaux traités par la stobadine comparés au groupe véhicule (**Tableau 5**). Cette réduction est notamment significative à 24 heures de reperfusion au niveau du volume cortical et de l'œdème ainsi qu'à 3 jours de reperfusion s'agissant des volumes total et cortical. La stobadine induit une nette diminution, bien que non significative, de l'ensemble des données histomorphométriques à 7 jours de reperfusion.

Volumés d'infarctus (mm ³)	24h		3 Jours		7 Jours	
	VEH (n=18)	STO (n=17)	VEH (n=8)	STO (n=10)	VEH (n=10)	STO (n=17)
Total	215,62 ±14,68	177,01 ±15,20	243,79 ±28,67	168,80 (*) ±14,00	191,09 ±22,80	144,54 ±16,64
Cortical	157,20 ±14,46	114,71 (*) ±14,56	189,27 ±23,99	119,00 (*) ±13,49	149,21 ±20,50	106,92 ±14,37
Sous cortical	58,44 ±2,73	62,29 ±2,21	59,25 ±2,37	49,80 ±2,30	41,88 ±3,54	37,62 ±2,73
Œdème	104,05 ±14,07	72,34 (*) ±7,82	111,81 ±16,26	74,13 (*) ±9,18	32,33 ±6,43	31,31 ±6,54

VEH: Véhicule STO: Stobadine *p<0,05 STO vs VEH

Tableau 5: Evolution des volumes d'infarctus et d'œdème comparés entre les animaux traités par la Stobadine et par son Véhicule

De la même façon que chez les animaux traités par le véhicule, une diminution progressive et significative au cours du temps des volumes d'infarctus sous cortical et d'œdème chez les animaux traités par la stobadine est observée et dès 3 jours de reperfusion en ce qui concerne le volume d'infarctus (**Figure 94**).

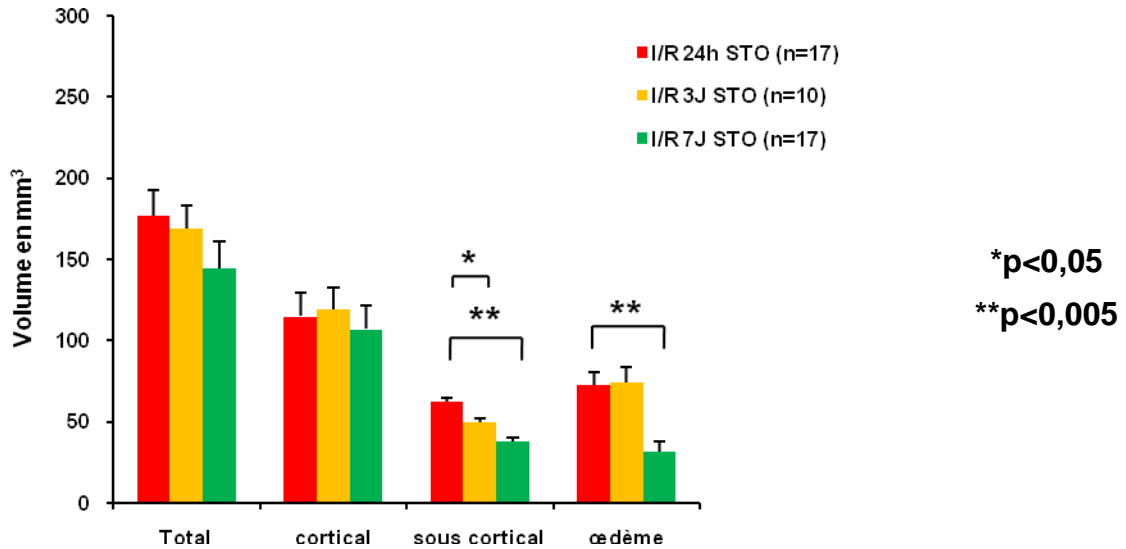


Figure 94: Evolution des volumes d'infarctus et d'œdème chez les animaux traités par la Stobadine

III.A.2. Effet de la Stobadine sur la densité de courant Kir2.x de la cellule musculaire lisse

Suite au traitement par la stobadine (groupe I/R-STO), on observe une prévention dès 24 heures de reperfusion de l'altération de la densité de courant Kir2.x avec une superposition des courbes courant-potential obtenues sur les cellules sham-veh, sham-sto et I/R 24h STO (**Figure 95A**). Il est à noter qu'aucune modification sur le courant n'intervient sur les animaux Sham traités par la Stobadine. A -135 mV où l'altération est maximale, les valeurs de densité de courant sont identiques entre les animaux ischémiés reperfusés 24h traités par la stobadine et les animaux sham (**Figure 95B**).

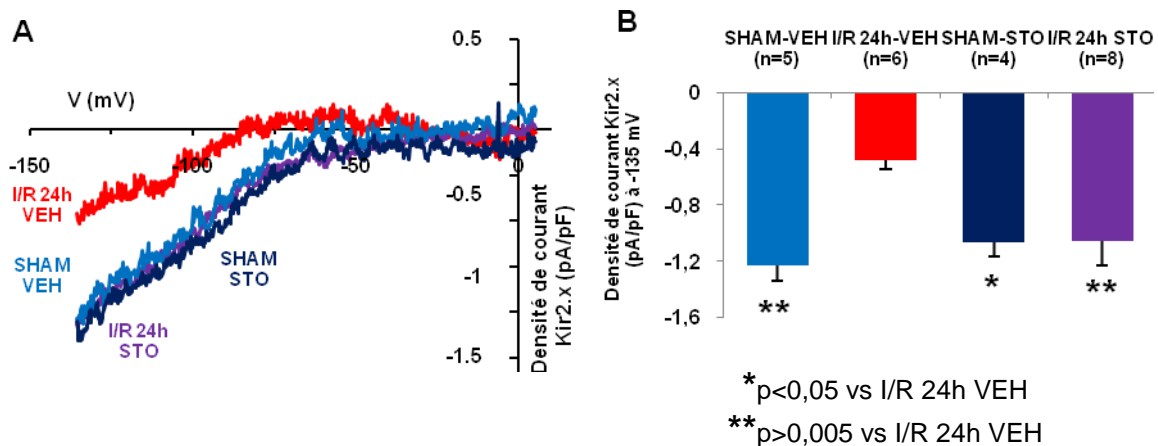


Figure 95: Effet d'un traitement par la Stobadine sur le courant Kir2.x de la cellule musculaire lisse

III.A.3. Effet de la Stobadine sur la relaxation potassium-dépendante sensible au baryum

A la différence de la densité de courant Kir2.x, la relaxation musculaire lisse potassium-dépendante sensible au baryum reste altérée à 24 heures de reperfusion chez les

animaux traités par la Stobadine ($11,01 \pm 1,86 \%$), comparée au groupe Sham traité par la Stobadine (Sham-STO : $26,29 \pm 5,51 \%$) et au groupe Sham traité par le véhicule (Sham-Veh : $34,29 \pm 5,48 \%$). Toutefois, le traitement permet une récupération significative de la récupération de la relaxation dès 3 jours de reperfusion (**Figure 96**).

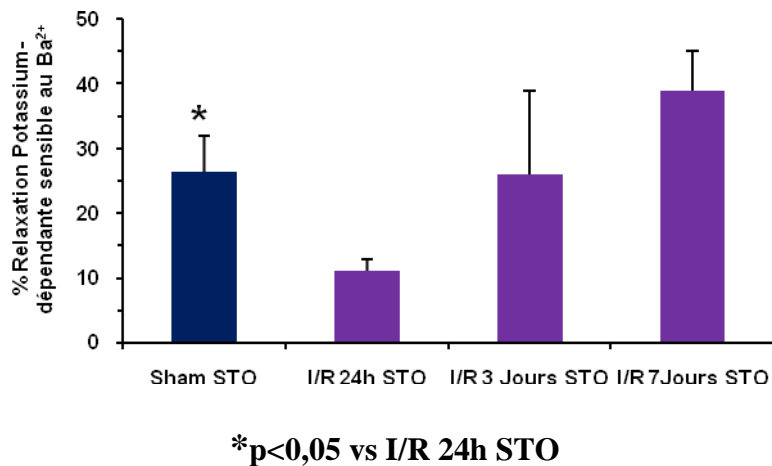


Figure 96: Effet d'un traitement par la Stobadine sur la relaxation potassium-dépendante sensible au baryum

III.A.4. Effet de la Stobadine sur la relaxation endothélium-dépendante

Concernant la relaxation endothélium-dépendante, le traitement par la Stobadine permet une prévention de l'altération dès 24 heures de reperfusion (**Figure 97**). Le pourcentage de relaxation chez les animaux traités étant comparable à la valeur obtenue en conditions sham correspondantes (I/R 24h STO : $20,72 \pm 2,63 \%$ et Sham STO : $23,74 \pm 2,19 \%$) et restant stables au décours de la reperfusion.

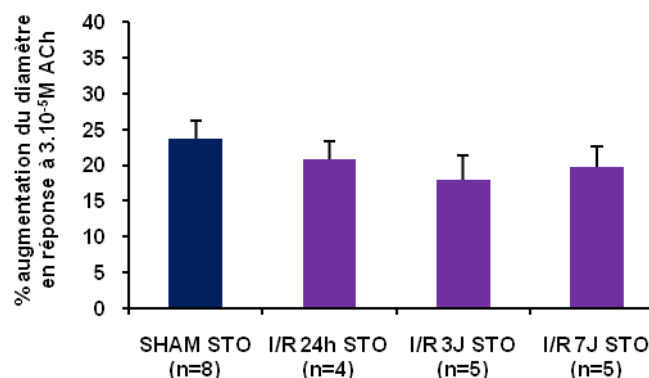


Figure 97: Effet protecteur de la Stobadine sur la relaxation endothélium-dépendante

III.A.5. Effet de la Stobadine sur les propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne

III.A.5.a. Effet de la Stobadine sur le tonus myogénique

Aucune modification du profil cinétique de récupération du tonus myogénique de l'artère cérébrale moyenne n'est observée suite au traitement par la Stobadine. La

récupération est significative ($p < 0,05$) à 7 jours de reperfusion comme sur les artères d'animaux traités par le véhicule (**Figure 98**).

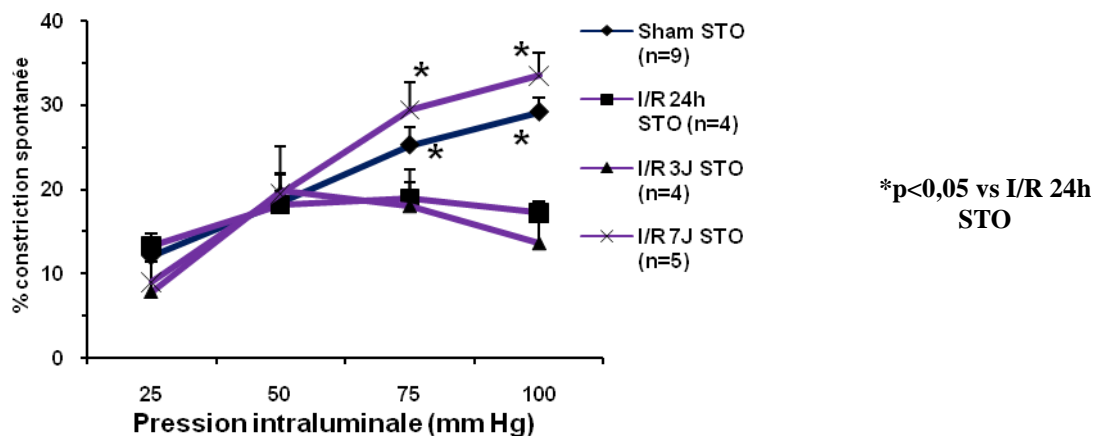


Figure 98: Effet de la Stobadine sur la réponse contractile spontanée du muscle lisse

Evolution du tonus myogénique en réponse à une augmentation de la pression intraluminale, à 24 heures, 3 jours et 7 jours de reperfusion sur les artères cérébrales moyennes issues d'animaux SHAM et I/R traités par la Stobadine.

III.A.5.b. Effet de la Stobadine sur les autres propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne

Le traitement par la Stobadine ne permet ni de prévenir l'altération ni d'accélérer la récupération de la fonction contractile du muscle lisse en réponse à la sérotonine pendant la période d'étude (**Tableau 6**). En revanche, le diamètre au repos de l'artère cérébrale moyenne reprend significativement ($p < 0,05$) ses caractéristiques initiales à 7 jours de reperfusion, améliorant ici la récupération vasculaire spontanée observée dans le groupe véhicule à 7 jours correspondant (**Tableau 4 page 149**). Aucune modification significative de la relaxation endothélium indépendante du muscle lisse vasculaire (réponse au SNP) n'est observée dans l'ensemble des groupes étudiés.

Groupes	Sham-Sto	I/R-STO		
		24 heures	3 Jours	7 Jours
Contraction en réponse à la sérotonine (%)	51,31 ± 3,09 (n=9)	35,55 ± 4,33 ** (n=4)	37,72 ± 5,44 * (n=4)	50,55 ± 4,40 (n=5)
Diamètre de repos (µm)	166,13 ± 5,38 (n=15)	195 ± 9,21 * (n=4)	206,20 ± 14,27 ** (n=5)	152,80 ± 6,18 # (n=5)
Relaxation en réponse au SNP (%)	122,98 ± 16,23 (n=15)	141,20 ± 17,22 (n=7)	81,53 ± 15,93 (n=4)	140,00 ± 49,21 (n=6)

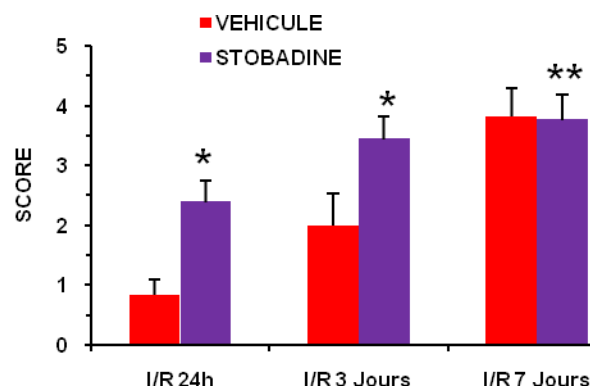
*p<0,05 I/R-Veh vs Sham-Veh **p<0,005 I/R-Veh vs Sham-Veh
#p<0,05 I/R Veh (Tableau 4) vs I/R Sto

Tableau 6: Effets de la Stobadine sur les propriétés actives de l'artère cérébrale moyenne

III.A.5.c. Effet de la Stobadine sur le comportement

(i) Test du ruban adhésif

Le traitement par la Stobadine à la phase aiguë de l'ischémie reperfusion permet une accélération significative de la récupération fonctionnelle sensorimotrice dès 24 heures de reperfusion par rapport aux animaux traités par le véhicule (**Figure 99**). Cependant malgré le traitement, cette accélération de la récupération ne permet pas d'atteindre le score maximal de 5 pendant la période d'étude qui s'étend jusqu'à 7 jours de reperfusion mais un niveau similaire à celui atteint par les animaux traités par le véhicule. (I/R 24h VEH : n=8, I/R 3J VEH : n=6, I/R 7J : n=6, I/R 24h STO: n=8, I/R 3J:n= 7, I/R 7J: n=13).



*p<0,05 vs I/R Veh respectifs **p<0,05 vs I/R 24h STO

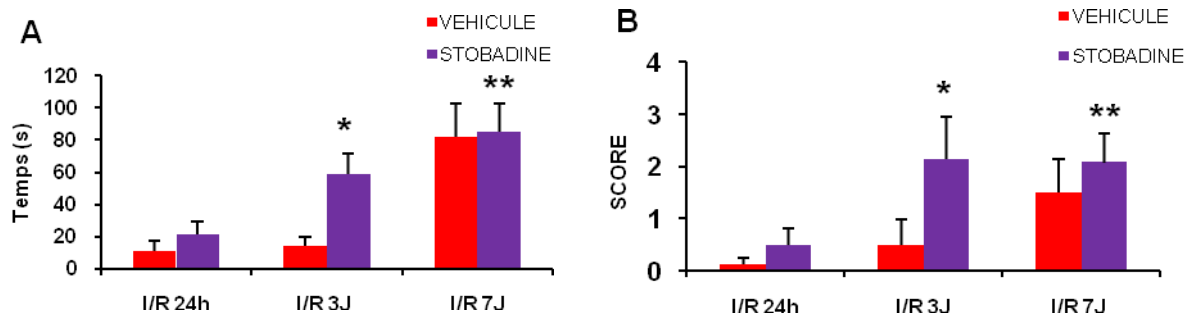
Figure 99: Accélération de la récupération fonctionnelle sensorimotrice par le traitement à la Stobadine

Comparaison de l'évolution de la récupération fonctionnelle sensorimotrice à 24 heures, 3 jours et 7 jours de reperfusion pour le test du ruban adhésif entre les animaux traités par le véhicule et ceux traités par la Stobadine.

(ii) Test de la traction préhensile

Le traitement par la Stobadine permet une récupération fonctionnelle motrice significative (p<0,05) dès 3 jours de reperfusion, accélérant ainsi la récupération spontanée observée chez les animaux traités par le véhicule (**Figure 100**). Cette récupération est

observée pour les deux systèmes d'évaluation de la performance des animaux (temps passé sur la barre et score).



*p<0,05 vs I/R 3J Veh **p<0,05 vs I/R 24h STO *p<0,05 vs I/R 3J Veh **p<0,05 vs I/R 24h STO
Figure 100: Accélération de la récupération fonctionnelle motrice par le traitement à la Stobadine

Comparaison de l'évolution de la récupération fonctionnelle motrice à 24 heures, 3 jours et 7 jours de reperfusion pour le test de la traction préhensile entre les animaux traités par le véhicule et ceux traités par la Stobadine.

Les animaux ne récupèrent pas intégralement leurs capacités motrices pendant la période de reperfusion étudiée, en ne réalisant pas des performances similaires à celles des animaux Sham (score 4).

III.B. Le Fénofibrate (agoniste PPARs- α)

III.B.1. Volumes d'infarctus à 3 jours de reperfusion

L'administration par gavage de fénofibrate à la dose de 50 mg/kg/j permet d'obtenir une neuroprotection à 3 jours de reperfusion se traduisant par une diminution significative (*p<0,05) des volumes d'infarctus total, cortical et sous cortical sans réduction toutefois de celui de l'œdème, comparés au groupe véhicule correspondant (**Figure 101**). Le même bénéfice n'est toutefois pas retrouvé à 24 heures de reperfusion.

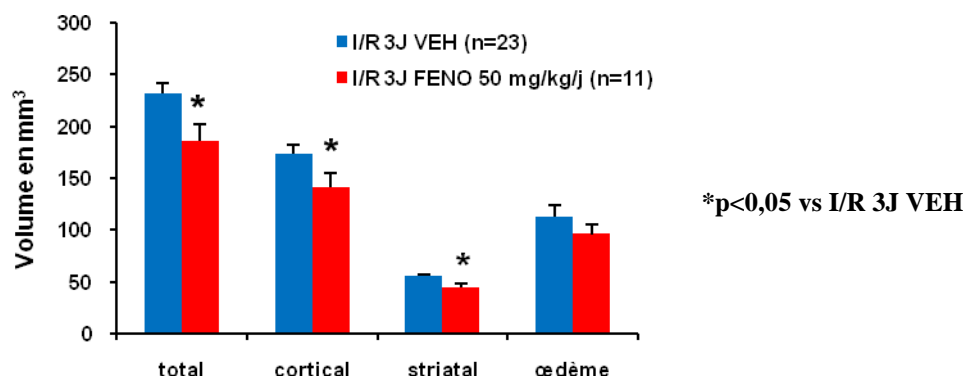


Figure 101: Effet du Fénofibrate (50 mg/kg/j) à 3 jours de reperfusion sur le volume d'infarctus et de l'œdème

Lorsque l'on compare l'effet du Fénofibrate à celui de la Stobadine à cette même

période d'étude (3 jours), on observe une réduction significative ($*p<0,05$) des volumes d'infarctus total et cortical chez les animaux traités par ces deux protocoles comparés à ceux traités avec leur véhicule respectifs. Des effets différents sont observés au niveau des volumes d'infarctus sous cortical (striatal) et de l'œdème. On observe en effet une réduction significative du volume d'infarctus striatal par le traitement au Fénofibrate qui n'est pas retrouvée avec celui de la Stobadine à la même période d'étude. En revanche, la Stobadine permet une réduction significative de l'œdème à 3 jours de reperfusion qui n'est pas retrouvée dans le traitement par le Fénofibrate (**Figure 102**).

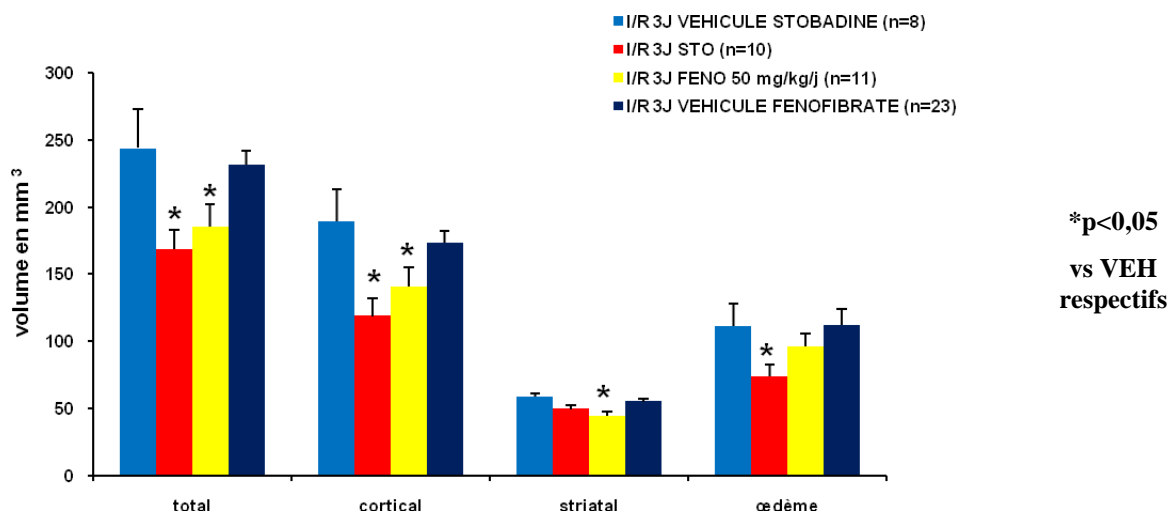


Figure 102: Effets neuroprotecteurs de la stobadine et du fénofibrate en phase aiguë à 3 jours de reperfusion

III.B.2. Relaxation potassium dépendante

Le traitement pharmacologique par le fénofibrate réalisé à la dose de 50 mg/kg/j ne permet pas de prévenir l'altération de la relaxation musculaire lisse potassium-dépendante et sensible au baryum qui s'opère à 24 heures de reperfusion. En revanche, une récupération totale est observée à 3 jours de reperfusion lorsque celle-ci est comparée au pourcentage de relaxation du groupe ischémié reperfusé véhicule correspondant induit par l'application de 15 mM de KCl (**Figure 103**).

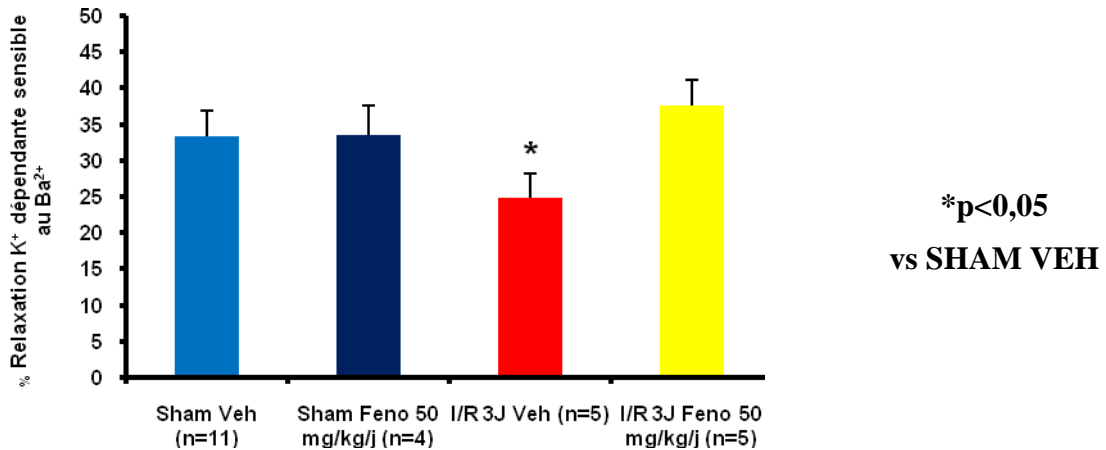


Figure 103: Effet du traitement à 3 jours par le fénofibrate à 50 mg/kg/j sur la relaxation potassium dépendante sensible au baryum

III.B.3. Relaxation endothélium dépendante

De la même façon que pour la relaxation potassium-dépendante du muscle lisse, le traitement réalisé à 24 heures de reperfusion à la dose de 50 mg/kg/j ne permet pas de prévenir l'altération de la relaxation endothélium-dépendante. La récupération significative (*<0,05) de celle-ci est permise là aussi à 3 jours de reperfusion, comparée au groupe sham véhicule correspondant suite à l'application de $3 \cdot 10^{-5}$ M d'acétylcholine (Figure 104).

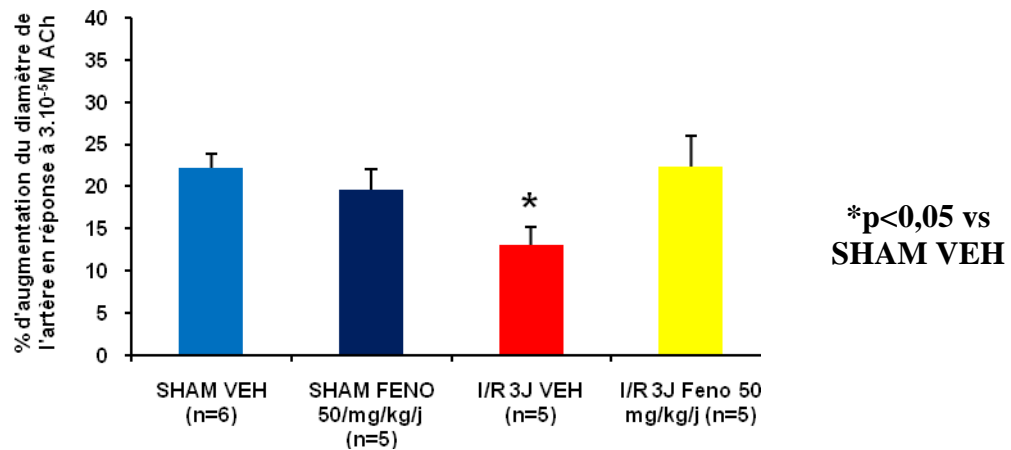


Figure 104: Effet du traitement à 3 jours par le fénofibrate à 50 mg/kg/j sur la relaxation endothélium-dépendante

III.B.4. Test comportementaux

III.B.4.a. Test du rotarod

Le traitement par le fénofibrate à la dose de 50 mg/kg/j permet une accélération significative (*p<0,05) de la récupération fonctionnelle motrice à 72 heures de reperfusion, comparé au groupe d'animaux traité par le véhicule correspondant (Figure 105). On note de plus un effet bénéfique mais non significatif du fénofibrate à 24 heures de reperfusion. Les rats sham maintiennent quant à eux leurs performances tout au long de la période d'étude.

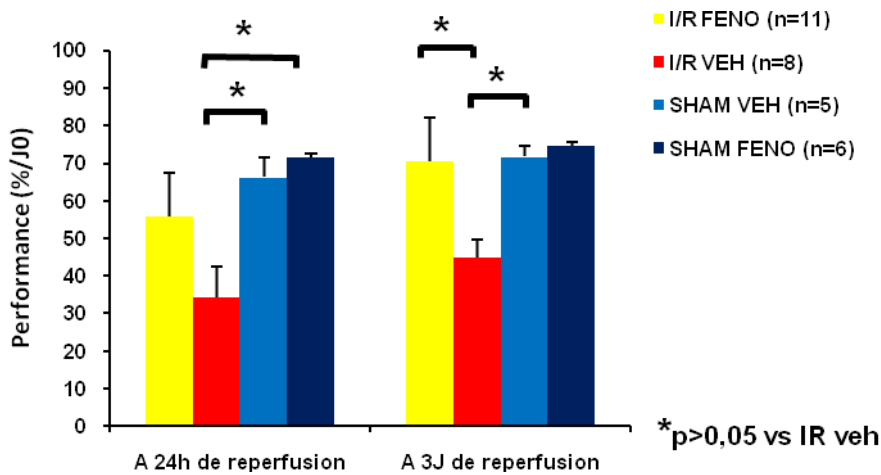


Figure 105: Accélération de la récupération fonctionnelle motrice à 3 jours par le traitement au Fénofibrate à la dose de 50 mg/kg/j

Évolution de la fonction motrice à 24 heures et 3 jours de reperfusion par le test du rotarod entre les animaux traités par le véhicule et ceux traités par le Fénofibrate.

III.B.4.b. Test du ruban adhésif

A la différence de la stobadine, on n’observe aucun effet bénéfique du fénofibrate sur la récupération sensori-motrice des animaux à 3 jours de reperfusion, comparés aux animaux traités par le véhicule (**Figure 106**). Les performances entre les groupes d’animaux ischémiés reperfusés traités respectivement par le véhicule et par le fénofibrate sont en effet similaires.

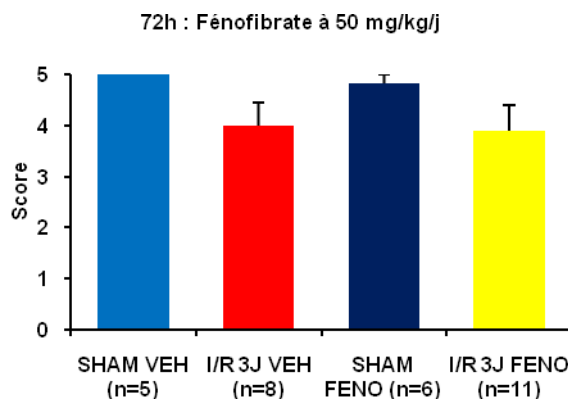


Figure 106: Évaluation de l’effet du fénofibrate sur la fonction sensorimotrice

Évolution de la fonction sensorimotrice à 3 jours de reperfusion par le test du ruban adhésif entre les animaux traités par le véhicule et ceux traités par le Fénofibrate.

Discussion

I. Résumé des résultats

Le processus d'ischémie reperfusion cérébrale engendre des lésions vasculaires et neuronales associées à des déficits fonctionnels. Sur la base d'un modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne, nos travaux confirment l'étendue de ces lésions à la phase aiguë de l'ischémie et montre pour la première fois la récupération, bien que partielle, de ces lésions sur une période d'étude de 7 jours de reperfusion correspondant à la phase subaiguë du processus d'ischémie reperfusion.

A la phase aiguë de l'ischémie, de nombreuses lésions affectent les différents compartiments du tissu vasculaire et cérébral. Au niveau du tissu cérébral, l'ischémie induit la formation d'un infarctus qui touche tant le niveau cortical que sous cortical avec la formation simultanée d'un œdème. Ces lésions sont reflétées par la diminution significative des performances des fonctions motrices et sensori-motrices évaluées par les 3 tests comportementaux utilisés. D'un point de vue électrophysiologique, notre étude montre que le processus d'ischémie reperfusion cérébrale affecte significativement l'activité de deux types de canaux potassiques (Kir2.x et Kv) du myocyte vasculaire, qui jouent respectivement un rôle majeur dans le couplage neurovasculaire en étroite relation avec l'activité du tissu neuroglial et la régulation du débit sanguin cérébral. A l'échelle du vaisseau perçu dans sa globalité, les différentes fonctions résultant de l'étroite relation entre d'une part les myocytes vasculaires et d'autre part les cellules endothéliales sont elles aussi perturbées au décours du processus de l'ischémie reperfusion. Effectivement, les deux types de relaxation étudiées (endothélium-dépendante et muscle lisse-dépendante activée par les canaux Kir2.x) se trouvent altérées, en parallèle de la majeure partie de ses propriétés actives caractérisées par la diminution de l'aptitude du vaisseau à contrôler son diamètre au repos ainsi que l'altération du tonus myogénique et de sa fonction contractile.

La poursuite de l'étude au cours du temps dans la phase subaiguë (s'étendant ici jusqu'à 7 jours), autre objectif de ces travaux, nous a permis d'observer pour la première fois l'évolution spontanée de l'ensemble des fonctions étudiées sous-tendant la notion de plasticité intervenant aux différents niveaux étudiés, ioniques, vasculaires, et cérébral. Cette évolution se traduit par la récupération, bien que partielle dans cette fenêtre d'étude temporelle, des différentes fonctions observées. Les lésions cérébrales et l'œdème s'estompent en effet progressivement au cours du temps en parallèle d'une récupération des performances sensori-motrices aux tests du ruban adhésif et de la traction préhensile ainsi qu'une tendance à la récupération motrice au test du rotarod à 3 jours de reperfusion. Ces récupérations

fonctionnelles sont effectives en parallèle d'une récupération vasculaire, suggérant ici la relation entre d'une part l'amélioration du fonctionnement vasculaire reflété par un contrôle retrouvé du débit sanguin cérébral et d'autre part le fonctionnement métabolique du tissu neuro-glial. La restauration vasculaire concerne le courant Kir2.x ainsi que la relaxation potassium-dépendante qui lui est associée, le tonus myogénique ainsi que la réponse contractile du muscle lisse. Cependant, ni la relaxation endothélium-dépendante, ni les caractéristiques au repos de l'artère ne sont restaurées.

En vue de contrer ces différentes lésions liées au processus d'ischémie reperfusion cérébrale, les stratégies protectrices que représentent les traitements pharmacologiques évalués ici par la Stobadine et le Fénofibrate nous montrent respectivement des effets certes différents mais bénéfiques à différents niveaux se traduisant soit par une prévention de l'altération soit par une accélération de la récupération de l'altération. Ces deux traitements ont une efficacité neuroprotectrice, reflétée par une diminution significative des lésions cérébrales et une amélioration des performances comportementales, au cours de la période d'étude. La Stobadine, par ses propriétés antioxydantes, permet notamment de prévenir l'altération du courant Kir2.x à la phase aiguë de l'ischémie et l'altération post-ischémique de la relaxation endothélium-dépendante, le Fénofibrate permet quant à lui dans ces conditions d'utilisation et d'administration, d'accélérer la récupération de cette relaxation par rapport à celle se réalisant spontanément.

Ces travaux nous amènent tout d'abord à recentrer ces observations avec l'hypothèse selon laquelle les différentes altérations ioniques et mécaniques du vaisseau cérébral participent à l'instauration de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. Nous mettons par la suite en évidence les notions de plasticité ionique, vasculaire et lésionnelle intervenant dans l'évolution spontanée des différentes fonctions qui ont été étudiées avec les effets bénéfiques de deux stratégies thérapeutiques représentées par la Stobadine et par le Fénofibrate.

II. Altérations électrophysiologiques des cellules musculaires lisses à la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion cérébrale

Le muscle lisse vasculaire cérébral se présente comme l'effecteur final responsable, par ses capacités de relaxation mais surtout de contraction, de la mise en place du tonus vasculaire régulant finalement le débit sanguin cérébral. Comme nous l'avons vu, de multiples influences provenant du compartiment endothélial et nerveux, sont exercées sur celui-ci amenant soit à une vasoconstriction soit à une vasodilatation des artères cérébrales. Notre travail s'est particulièrement intéressé à l'activité des canaux potassiques des myocytes vasculaires car, en contribuant largement à la régulation du potentiel de membrane, ils participent activement à la mise en place ainsi qu'à la régulation du tonus vasculaire. Une dérégulation de l'activité de ceux-ci contribue à une mauvaise reperfusion du tissu cérébral, spécifiquement dans la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion.

II.A. Rôle de la reperfusion dans l'altération du courant Kir2.x et du couplage neurovasculaire qui lui est associé.

Un élément important dans la mise en place des altérations ioniques vasculaires est la phase de reperfusion. Cette étape aboutit comme nous l'avons vu, à la formation de dérivés activés de l'oxygène, impliquant la formation de molécules de peroxyde d'hydrogène, de radicaux hydroxyles et d'anions superoxydes qui ont tous des effets délétères directs ou indirects sur les canaux ioniques en général et sur les canaux potassiques dans notre cas. La production de l'anion superoxyde est augmentée dans les premiers moments de la phase de reperfusion et se prolonge dans les deux heures suivantes au décours de la reperfusion (Nelson *et coll*, 1992), montrant par ici l'intérêt de l'utilisation dans cet intervalle de temps d'agents aux propriétés antioxydantes que nous mettrons par la suite en évidence. Les espèces radicalaires générées sont capables de modifier les mouvements et le transport des ions par différents mécanismes. Elles induisent d'une part un changement du statut d'oxydoréduction des protéines canalaire notamment par l'oxydation des groupements thiols (-SH) et d'autre part une modification de l'environnement avoisinant des transporteurs ioniques par la peroxydation lipidique déclenchée par la surproduction de NO et par la formation de peroxy-nitrite à la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion (Annunziato *et coll*, 2002; Kourie, 1998; Rubbo *et coll*, 1994).

Sous la suspicion de l'effet délétère de la reperfusion sur le fonctionnement du vaisseau cérébral, des travaux réalisés au laboratoire avaient montré qu'au niveau du muscle lisse, la relaxation potassium-dépendante ne présentait pas d'altération fonctionnelle aussi bien en terme de relaxation analysée en vasoréactivité qu'en terme de diminution de la densité de courant Kir2.x après une période d'ischémie seule. En revanche, lorsque l'ischémie est suivie d'une phase de reperfusion (24 heures ici), l'ensemble de ces deux composantes est altérée tant en vasoréactivité qu'en étude électrophysiologique par patch-clamp (Bastide *et coll*, 1999; Petrucci *et coll*, 2004). La reperfusion, caractérisée par le pic de stress oxydant généré semble par conséquent être l'événement initiateur de la mise en place de l'altération du muscle lisse vasculaire cérébral observée à la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion. Comme tous les canaux potassiques, les canaux Kir2.x sont formés d'une boucle P extracellulaire, responsable du passage des ions K⁺, possédant un résidu lysine très sensible à l'oxydation (Nelson *et coll*, 1995). En plus de cette cible potentielle, le canal possède de nombreux résidus cystéines dont l'oxydation mène à une modulation des propriétés électrophysiologiques notamment au niveau de la probabilité d'ouverture du canal (Garneau *et coll*, 2003; Rozanski et Xu, 2002). L'altération observée peut aussi être mise en relation avec la perturbation du métabolisme des polyamines observée dans des modèles d'ischémie globale, qui comme nous l'avons vu participe directement aux propriétés électrophysiologiques de rectification entrante du canal (Johnson, 1998; Li *et coll*, 2007).

A l'action délétère, à priori directe, du stress oxydant sur la protéine canal à la phase aiguë, peut s'ajouter une action indirecte par la dérégulation potentielle du courant Kir2.x par l'endothéline-1 via la voie de la protéine kinase C, même si celle-ci fut uniquement mise en évidence au niveau des cellules musculaires de l'artère coronaire de lapin (Park *et coll*, 2005). Effectivement, il est montré qu'à la phase aiguë s'opère une augmentation significative de la concentration en endothéline-1 du tissu cérébral et plasmatique, contribuant ainsi à la diminution de la densité de courant Kir2.x à la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion (Matsuo *et coll*, 2001).

La relaxation potassium dépendante associée à l'activation des canaux Kir2.x du muscle lisse fait partie d'un système complexe de couplage entre d'une part le métabolisme du tissu cérébral et d'autre part le débit sanguin cérébral intégré sous la notion d'hyperémie fonctionnelle. La corrélation entre l'altération de la densité de courant Kir2.x et les lésions cérébrales (volumes d'infarctus) montre l'importance de cette relaxation dans le concept de couplage neurovasculaire (Bastide *et coll*, 1999).

II.B. Mise en évidence de l'altération des canaux Kv à la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion

Une conductance potassique de la cellule musculaire lisse jusqu'alors peu étudiée dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale est la composante voltage dépendante ou Kv. Au niveau du vaisseau où elle est fortement représentée, elle joue un rôle physiologique important, son activation par la dépolarisation membranaire en réponse à l'augmentation de la pression intravasculaire permet de repolariser la cellule musculaire lisse, limitant l'influx calcique via les canaux calciques voltage dépendants et donc l'activation de l'appareil contractile du myocyte, menant à une relaxation du muscle lisse vasculaire dans le cadre du tonus myogénique (Jackson, 2000; Knot et Nelson, 1995).

Notre étude a ainsi ciblé les myocytes vasculaires de l'artère cérébrale moyenne, artère de grand calibre (environ 200 μm) qui est un point de départ des vaisseaux artériels pénétrants dans le tissu cérébral, avec un calibre qui diminue progressivement de l'artériole (40 μm) jusqu'au stade capillaire (10 μm). Il est important de mentionner que des études réalisées *in vitro* sur des artères et artérioles pénétrantes pressurisées ont montré que leur potentiel de membrane, stimulus activateur de cette composante potassique voltage-dépendante, ne varie pas de façon significative (cependant une faible variation de potentiel peut avoir une influence importante sur l'état de constriction). Cette caractéristique nous permet ainsi de pouvoir, en étudiant l'activité des canaux Kv des myocytes de l'artère cérébrale moyenne, d'effectuer une bonne évaluation du rôle physiologique de ces canaux dans les artérioles pénétrantes qui constituent le véritable site d'échanges métaboliques entre le compartiment vasculaire et le tissu cérébral contrôlé par le débit sanguin cérébral (Faraci et Sobey, 1998).

La mise en évidence de cette composante potassique voltage-dépendante au niveau du muscle lisse vasculaire est possible par l'application de 4 aminopyridine, inhibiteur sélectif des canaux potassiques voltage dépendants. Une vasoconstriction de l'artère basilaire de rat a été démontrée *in vivo* suite à l'application de 4-aminopyridine (Sobey et Faraci, 1999). La nature moléculaire de cette composante résulte de l'expression simultanée de différentes isoformes de sous unités alpha et bêta au niveau des artères cérébrales. Cette hétérogénéité d'expression de cette composante sensible à la 4-aminopyridine se révèle par des caractéristiques électrophysiologiques différentes des courants Kv avec une multitude de propriétés d'activation, d'inactivation et de sensibilité de blocage à la 4-aminopyridine (Thorneloe *et coll*, 2001). Ainsi, au niveau de l'artère cérébrale moyenne de rats, plusieurs isoformes ont été détectées appartenant à deux grandes familles : les Kv1 et les Kv2 avec

l'expression des isoformes Kv1.2 et Kv1.5 et Kv2.1 (Amberg *et coll*, 2006; Chen *et coll*, 2006). Une participation à la hauteur de 50% entre ces deux grandes familles de canaux est d'ailleurs montrée sur les artères cérébrales, confirmant le caractère hétérogène de cette composante sensible à la 4-aminopyridine, dans la régulation du tonus vasculaire en situation de constriction myogénique.

II.C. Altération de la densité de courant Kv suite au processus d'ischémie reperfusion cérébrale avec une implication de l'hypoxie (ischémie) et de la reperfusion.

Notre étude, bien que ne faisant pas la distinction entre ces différentes isoformes, a dégagé une composante Kv sensible à la 4-aminopyridine au niveau de l'artère cérébrale moyenne de rat. Suite à l'ischémie reperfusion, nos résultats montrent une réduction significative du courant Kv (26,07 % par rapport à la valeur SHAM correspondante), dans une gamme de potentiel où cette conductance exerce précisément son rôle physiologique de repolarisation du potentiel de membrane. En conditions post-ischémiques il s'ensuit donc un défaut de repolarisation et par conséquent de contrôle du tonus vasculaire contribuant à une mauvaise reperfusion du tissu cérébral à la phase aiguë de l'ischémie. Les mécanismes délétères responsables de la réduction de la densité de courant Kv peuvent trouver leur origine aussi bien au cours de la phase d'ischémie que de la phase de reperfusion.

Cette diminution de la densité de courant Kv est retrouvée dans d'autres situations physiopathologiques que celle de l'ischémie reperfusion cérébrale. Elle a notamment été mise en évidence en situation d'hypoxie correspondant à une diminution de la pression partielle en O₂, phase comparable à celle retrouvée dans le contexte ischémique. Une étude montre que l'hypoxie provoquée au niveau de cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires de lapin provoque via l'inhibition de canaux potassiques, dont la composante voltage dépendante (Kv), une dépolarisation membranaire menant à la vasoconstriction artérielle pulmonaire (vasospasme). Il est à noter que l'hypoxie n'affecte pas seulement les canaux Kv mais aussi les canaux K_{ATP} et K_{Ca}²⁺, montrant là une sensibilité sélective des canaux potassiques face à l'hypoxie (Hong *et coll*, 2005).

Plus intéressants sont les effets retrouvés de l'hypoxie sur les différentes isoformes de canaux Kv qui sont exprimées dans les vaisseaux impliqués dans notre modèle d'ischémie reperfusion cérébrale. Une hypoxie prolongée (d'une durée de 24 heures), réalisée sur des myocytes vasculaires en culture, est susceptible de réprimer au niveau transcriptionnel les différentes sous unités alpha Kv1.2, Kv1.5 et Kv2.1 exprimées dans les artères cérébrales.

L'importance de cette répression est corrélée à la durée d'hypoxie avec un effet inhibiteur intermédiaire à 6 heures, menant à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et à une vasoconstriction (Hong *et coll*, 2004). Dans le cadre de l'ischémie, des mécanismes similaires à ceux de l'hypoxie pourraient participer à la diminution de la densité de courant Kv.

Suite à l'ischémie, la phase de reperfusion génère des effets particulièrement délétères sur les canaux ioniques vasculaires. Comme nous l'avons vu précédemment, la reperfusion est marquée par le retour des constituants sanguins dans les territoires ayant subi le processus ischémique. Ce retour sanguin, bien qu'à première vue bénéfique pour le tissu cérébral, est notamment marqué par la genèse d'un stress oxydant capable, entre autre, d'altérer les canaux ioniques, comme nous l'avons vu pour la composante Kir2.x. Dans un modèle d'hémorragie subarachnoïdienne, le retour d'oxyhémoglobine lors de la phase de reperfusion, est à l'origine d'une diminution de la densité de courant Kv sensible à la 4-aminopyridine induisant un vasospasme dans un modèle expérimental de canulation d'artère cérébrale de lapin (Ishiguro *et coll*, 2006). Dans cette étude, il est suspecté que cette diminution de courant Kv est liée à l'action de tyrosines kinases qui interagiraient avec le cycle d'internalisation des canaux par induction de leur endocytose, provoquant de ce fait la diminution de la densité de courant Kv par réduction du nombre de canaux actifs à la surface membranaire. Une évaluation immunohistochimique ou par western blot des différentes sous unités exprimées dans ces conditions serait alors judicieuse dans le but de corroborer la diminution de la densité de courant à la diminution de présence de canaux actifs à la surface membranaire.

Au cours de cette phase de reperfusion comme il a été décrit pour les canaux Kir2.x, le stress oxydant peut également modifier le statut d'oxydoréduction des différents groupements sensibles de la protéine canal (particulièrement des résidus thiols) ainsi que la fluidité membranaire, par l'action délétère du peroxy-nitrite (ONOO⁻) formé par la combinaison entre les radicaux libres dérivés de l'oxygène et le NO. Ces modifications structurales peuvent induire des dysfonctionnements canaux.

II.D. Implication de la voie du NO dans la régulation du courant Kv en condition basale et après ischémie reperfusion.

Une étude de vasoréactivité *in vivo* réalisée par Sobey *et coll* (1999) sur des artères basilaires endothélialisées et pressurisées de rats Sprague-Dawley montrait que la relaxation induite par un donneur de NO pouvait être réduite suite à l'application de la 4-

aminopyridine. Cet effet pouvait être dû à l'activation de la composante potassique voltage-dépendante via la voie du NO/GMPc. De manière concomitante, des travaux réalisés *in vitro*, notamment sur l'artère cérébrale moyenne de rat, montraient que l'application de DEANONOate induisait une vasodilatation ne passant pas par la voie du GMPc mais par une activation directe des canaux potassiques dépendants du calcium intracellulaire, comme cela avait déjà été décrit auparavant expérimentalement par patch-clamp en configuration cellule excisée (Bolotina *et coll*, 1994; Yu *et coll*, 2002). Notre étude avait donc pour objectif de mettre en évidence par une étude électrophysiologique directe en patch-clamp un effet du NO en testant l'effet du DEANONOate sur la composante potassique voltage-dépendante de l'artère cérébrale moyenne de rat.

De manière contradictoire avec les études précédemment décrites, nous n'avons observé aucune modulation positive ou négative du NO sur la densité de courant Kv des myocytes vasculaires en conditions SHAM. Cette disparité de l'action du NO sur la composante Kv pourrait s'expliquer par différents arguments. Tout d'abord, il est à noter que les expériences ne s'effectuent pas sur la même souche de rat, les travaux de Sobey et Faraci de 1999 sont réalisés sur des rats de souche Sprague Dawley alors que l'ensemble de notre étude est réalisée sur des rats Wistar. De plus, l'activité de la composante Kv observée initialement est étudiée sur des artères *in vivo*, c'est à dire dans des conditions plus intégrées qui se rapprochent plus de la physiologie. Dans ces expériences les artères sont pressurisées avec un tonus myogénique basal et sous le contrôle de l'endothélium. La mise en jeu de ces contrôles environnementaux pourrait ainsi être impliquée. En revanche, notre étude repose sur une exploration directe réalisée sur des cellules musculaires lisses vasculaires fraîchement dissociées et coupées de l'influence endothéliale permettant de mettre à jour un mécanisme purement musculaire.

En raison de l'augmentation accrue de la production de NO par les différentes NO synthases dans les premières phases du processus d'ischémie reperfusion cérébrale, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle cette voie de régulation en condition d'ischémie reperfusion pourrait influencer ou moduler la densité de courant Kv (Iadecola, 1997). Les observations effectuées en conditions d'ischémie reperfusion nous montrent une accentuation de l'altération observée à 24 heures de reperfusion sous la forme d'une réduction plus importante de la densité de courant Kv. Nous sommes donc en présence d'une modulation différentielle de la densité de courant Kv en condition SHAM et en condition d'ischémie reperfusion à la phase aiguë sous tendant une activité spécifique des différents intervenants de la voie NO/GMPc/PKG dans cette pathologie. Cette potentialisation de l'altération intervient

en effet soit par l'action directe du NO produit par le DEANONOate (diminution de 52,8 % par rapport à la valeur SHAM) sur la composante potassique voltage-dépendante soit par une action indirecte impliquant la voie de la guanylate cyclase précédemment décrite. L'utilisation de modulateurs de cette voie de signalisation (8-BrGMPc et T-1032) menant à l'augmentation intracellulaire en GMPc montre dans tous les cas une similitude d'effets potentialisateurs de l'altération (respectivement 51,6 % et 46,4 % par rapport au groupe SHAM) suspectant son intervention dans l'induction de la potentialisation de l'altération en condition d'ischémie reperfusion à la phase aiguë plutôt qu'une action directe du NO sur les canaux Kv.

Les enregistrements réalisés en configuration patch-perforé amènent quelques éléments de réponse quant à la nature de la potentialisation délétère. Cette configuration a l'avantage de préserver l'interaction des constituants intracellulaires avec les canaux ioniques (notamment le GMPc) dans les conditions post-ischémiques au moment de l'enregistrement. La valeur de densité de courant Kv en condition d'ischémie reperfusion à la phase aiguë étant similaire à celle obtenue en configuration whole-cell en présence de donneurs de NO. Le GMPc peut, de ce fait, apparaître ici comme un intermédiaire de cette potentialisation, hypothèse confirmée par les effets potentialisateurs retrouvés suite à l'application de deux agents, le 8-BrGMPc et le T-1032, provoquant une augmentation intracellulaire en GMPc. Cette augmentation de GMPc intracellulaire est retrouvée dans une autre situation physiopathologique, les rats obèses (Zucker), et résulte d'un affaiblissement de sa dégradation par les phosphodiesterases (Russo *et coll*, 2008), suggérant l'intervention d'un mécanisme similaire dans l'ischémie reperfusion.

A un autre niveau de la cascade de régulation de la voie NO/GMPc/PKG, l'activité de la guanylate cyclase soluble peut être perturbée en condition d'ischémie/reperfusion et moduler la densité de courant Kv via une augmentation de la synthèse de GMPc. Une étude a démontré sur des artères piales de rats dans un modèle d'ischémie transitoire de 2 heures que la production de GMPc est augmentée dans les premières minutes de la reperfusion suite à une activation significative de l'activité de la guanylate cyclase (Hashimoto *et coll*, 1999), et à l'augmentation de la quantité de NO générée par les différentes NO synthases en période ischémique (Browner *et coll*, 2004). Cependant, cette suractivation de la guanylate cyclase n'est que transitoire, le stress oxydant conduisant à terme à une diminution de l'activité de la guanylate cyclase en partie responsable d'une hypoperfusion par une diminution de la relaxation des cellules musculaires lisses de l'artère. Cette diminution de l'activité de la guanylate cyclase est due à un moindre niveau

d'expression des ARNm, concomitant à une augmentation de l'hydrolyse du GMPc par les phosphodiesterases de type 5 (Gerassimou *et coll*, 2007; Sobey et Quan, 1999).

Enfin un autre mécanisme lié à l'appareil contractile peut également intervenir, le système RhoA-RhoKinase qui interagit avec la myosine phosphatase de la chaîne légère de la myosine mais également avec les canaux Kv de la cellule musculaire lisse via la voie de la PKG (Hilgers et Webb, 2005; Luykenaar et Welsh, 2007). Il a été démontré que dans différentes situations physiopathologiques, ce système peut induire des vasospasmes cérébraux par l'activation du système RhoA-ROCK tant au niveau du muscle lisse que de l'endothélium laissant supposer un effet délétère simultané sur les canaux Kv menant à la vasoconstriction post-ischémique (Chrissobolis et Sobey, 2006).

Cet effet du NO au décours de l'ischémie reperfusion décrit ici, met en lumière une nouvelle action délétère du NO à la phase aigüe de l'ischémie. La réduction de densité de courant Kv en combinaison avec la réduction de la densité de courant Kir2.x vont contribuer à une mauvaise perfusion du tissu cérébral. Afin de mieux comprendre les mécanismes intracellulaires responsables de cette dysrégulation du fonctionnement des canaux Kv, il serait intéressant de mesurer la concentration intracellulaire en GMPc après ischémie reperfusion et d'observer si le GMPc, qui constitue à priori un acteur essentiel dans la réduction de la densité de courant Kv, agit en stimulant l'activité des PKG par l'évaluation de l'effet d'un bloqueur sélectif. De plus, pour expliquer les effets différentiels observés de la modulation du NO entre artère cérébrale moyenne et les myocytes vasculaires isolés, des évaluations *in vitro* des effets de la voie NO/PKG sur artères pressurisées (artériographe d'Halpern) seraient indispensables.

II.E. Participation des canaux K_{Ca} et K_{ATP} aux altérations électrophysiologiques à la phase aigüe du processus d'ischémie reperfusion

A l'instar des conductances potassiques Kir2.x et Kv décrites précédemment, les canaux BK_{Ca} et K_{ATP} sont eux aussi affectés par le processus d'ischémie reperfusion cérébrale. Il a été montré que l'hypoxie induit un découplage, selon un mécanisme non encore élucidé, entre l'influx calcique généré sous forme de "sparks" par le réticulum sarcoplasmique et le canal BK_{Ca} , provoquant une réduction de l'activité du canal (Zhao *et coll*, 2007). Le peroxyde d'hydrogène généré quant à lui pendant la phase de reperfusion cible particulièrement un résidu cystéine se trouvant au niveau du site responsable de la sensibilité au calcium intracellulaire de la sous unité auxiliaire Slo $\beta 1$ participant à la réduction de l'activité du canal (Tang *et coll*, 2004). Une réduction de l'activité des K_{ATP} est aussi mise en évidence suite à

l'action de l'anion superoxyde en condition d'enregistrement en patch-clamp en configuration cellule entière, et par une réduction de la vasodilatation induite par un activateur des canaux K_{ATP} , le cromakalim, au niveau des artères cérébrales (Ross et Armstead, 2003).

La phase ischémique ainsi que la phase reperfusion via le stress oxydant généré mènent donc à la mise en place de conséquences fonctionnelles sur le muscle lisse vasculaire cérébral. Ces altérations ciblant les canaux potassiques entraînent une mauvaise reperfusion du tissu cérébral en période post-ischémique aiguë en contribuant aux altérations vasculaires mécaniques que nous allons développer maintenant.

III. Altérations des propriétés mécaniques du vaisseau à la phase aiguë

III.A. Altération du muscle lisse vasculaire cérébral

Les différentes propriétés mécaniques inhérentes au muscle lisse vasculaire sont altérées suite au processus d'ischémie reperfusion. Les canaux Kir2.x contribuent au maintien du potentiel de membrane des myocytes vasculaires et sont impliqués dans l'adaptation du débit sanguin cérébral au métabolisme neuronal. Leur activation par le potassium extracellulaire dans une gamme de concentration déterminée induit une vasodilatation de l'artère cérébrale moyenne de façon indépendante aux conditions de pressions intravasculaires (Johnson *et coll*, 1998). De façon concomitante à la diminution de la densité de courant Kir2.x suite à la phase de reperfusion, une perturbation post-ischémique de la relaxation musculaire lisse en réponse à des concentrations de potassium extracellulaire (5 à 20 mM) a été caractérisée suite au processus d'ischémie reperfusion (Marrelli *et coll*, 1998). Cette perte de réponse à l'élévation de K^+ extracellulaire n'est pas due à l'ischémie mais intervient suite à la phase de reperfusion (Bastide *et coll*, 2003). Elle contribue à l'altération des propriétés mécaniques du vaisseau et empêche l'adaptation du débit sanguin cérébral aux besoins métaboliques neuronaux en phase post-ischémique.

En plus de leur innervation extrinsèque les rendant sensible à l'influence du système nerveux périphérique, les artères piales présentent des propriétés myogéniques adaptées pour des pressions intravasculaires élevées retrouvées à ce niveau de la circulation alors que les artérioles pénétrantes, elles aussi sous l'influence nerveuse, possèdent une réponse myogénique adaptée à de faibles pressions (Cipolla *et coll*, 2004; Golding *et coll*, 1998). Notre étude a montré l'impact délétère sur le mécanisme d'autorégulation à la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion, par l'induction d'altérations du tonus myogénique,

de la réponse contractile à la sérotonine du muscle lisse et l'incapacité du vaisseau à pouvoir maintenir un diamètre vasculaire normal dans des conditions basales. Suite au processus d'ischémie reperfusion, une réduction significative du tonus myogénique a été décrite au cours des trente premières minutes de la phase aiguë de l'ischémie (Cipolla *et coll*, 1997). Le vaisseau n'est alors plus capable de réagir en se contractant face à une augmentation ou une variation du débit sanguin cérébral. Le contrôle de celui-ci, essentiel pour entretenir les échanges métaboliques, se trouve alors altéré et le diamètre augmente de façon linéaire avec la pression artérielle. Cette même observation a d'ailleurs été récemment retrouvée au niveau de l'artère cérébrale moyenne dans une étude de vasoréactivité réalisée sur des artérioles pénétrantes dans un modèle d'ischémie reperfusion similaire, confirmant l'impact délétère du processus d'ischémie reperfusion sur l'ensemble de la microcirculation cérébrale (Cipolla et Bullinger, 2008).

Le stress oxydant participe à la mise en place des altérations des propriétés mécaniques des vaisseaux à la phase aigue de l'ischémie. *In vivo*, les espèces réactives de l'oxygène (notamment l'anion superoxyde) générées pendant les deux premières heures du processus d'ischémie reperfusion, participent à l'altération du mécanisme d'autorégulation du débit sanguin cérébral (Nelson *et coll*, 1992). Le mécanisme de la fonction contractile myogénique et plus généralement de l'autorégulation des artères de résistance, dépend de la structure du cytosquelette et surtout de sa composition en filament d'actine. Plusieurs travaux ont montré qu'au décours de l'ischémie reperfusion, la polymérisation de l'actine était modifiée au niveau des myocytes vasculaires, mais aussi dans d'autres types cellulaires (Banan *et coll*, 2001). La nitrosylation des filaments d'actine, concomitante à la surproduction de peroxy-nitrite à la phase aiguë, conduit à leur dépolymérisation dans les mêmes délais que celle de la perte du tonus myogénique, à savoir dans les six heures suivant la phase de reperfusion. Cela suggère que le changement de la composition en actine du cytosquelette pourrait participer à la mise en place de l'altération de la fonction myogénique (Maneen et Cipolla, 2007; Maneen *et coll*, 2006). De plus, le tissu conjonctif joue un rôle déterminant dans la conduction des propriétés mécaniques exercées par l'ensemble des cellules musculaires lisses de l'artère. Il est observé suite au processus d'ischémie reperfusion un remodelage de la paroi vasculaire se caractérisant par une altération de la quantité du tissu conjonctif reflétée par une diminution du niveau de collagène et d'élastine suite à l'activation d'élastase des neutrophiles polynucléés circulant au sein du vaisseau cérébral contribuant d'une part à l'augmentation du diamètre au repos observé en phase post-ischémique et à la

moindre efficacité des cellules musculaires dans la participation au mécanisme du tonus myogénique (Iwatsuki *et coll*, 1998; Jimenez-Altayo *et coll*, 2007).

III.B. Altération de la relaxation endothélium-dépendante

Des études antérieures avaient déjà montré que le compartiment endothélial participait à l'instauration des altérations vasculaires en période post-ischémique, notamment par une diminution du potentiel relaxant de la paroi vasculaire, en réponse à l'acétylcholine. Cette mise en place de l'altération de la relaxation endothélium-dépendante est la résultante d'une participation commune et synergique de la phase d'ischémie et de la phase de reperfusion (Bastide *et coll*, 2003; Cipolla *et coll*, 1997).

La phase ischémique est responsable d'une réduction significative mais intermédiaire de la vasorelaxation en réponse à l'acétylcholine. La vulnérabilité de la cellule endothéliale vis-à-vis du stress hypoxique est complexe, et pourrait participer à l'instauration de la dysfonction endothéliale post-ischémique en induisant un remodelage de nombreuses voies physiologiques cellulaires. La phase de reperfusion induit une altération maximale de la vasorelaxation endothélium-dépendante qui persiste même dans la phase subaiguë, selon notre observation expérimentale prolongée jusqu'à 7 jours en phase post-ischémique. Cette phase de reperfusion induisant l'altération endothéliale est susceptible de faire intervenir une multitude de mécanismes délétères pouvant agir de façon simultanée dans la phase aiguë et se prolonger au cours de la phase subaiguë du processus d'ischémie reperfusion.

Dans les premiers instants de la reperfusion, la diminution de la biodisponibilité du NO d'origine endothéliale peut être due à sa combinaison avec les radicaux libres dérivés de l'oxygène pour former le peroxynitrite (ONOO⁻) et constituer une première voie d'explication de la diminution de la vasorelaxation. Une étude a montré l'effet bénéfique d'un traitement en période pré-ischémique de l'administration d'une faible dose de lipopolysaccharide bactérien induisant une amélioration de la fonction endothéliale par l'augmentation de la production de NO, et donc de sa biodisponibilité, par les NOS 3 exprimées au niveau des vaisseaux cérébraux (Puisieux *et coll*, 2000).

L'endothélium présente également une désorganisation structurale siège d'une augmentation de la perméabilité vasculaire (Kontos, 2001). L'inflammation post-ischémique conduit à l'expression de nombreuses cytokines telles que le TNF α et l'interleukine 1 β . Elles sont impliquées dans l'activation des cellules gliales et des macrophages ainsi que dans les processus d'activation des polynucléaires neutrophiles se traduisant par leur adhésion à l'endothélium vasculaire et à leur migration au sein du tissu cérébral, contribuant à la

majoration des lésions ischémiques. L'expression des molécules d'adhésion telles qu'ICAM-1 et VCAM-1 (Frijns *et coll*, 2002) ainsi que des protéines de dégradation de la matrice extracellulaire comme les MMP-9 (del Zoppo *et coll*, 2003), participent à cette désorganisation structurale de l'endothélium. Ces observations ont ainsi été confirmées par les effets bénéfiques sur la fonction endothéliale et en terme de neuroprotection par l'induction d'une neutropénie par injection de vinblastine en période pré-ischémique (Petrault *et coll*, 2005). Ces mécanismes apparaissent rapidement après l'ischémie reperfusion et contribuent probablement à l'installation de la dysfonction endothéliale et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire, responsable entre autre de la formation de l'œdème observée dans nos résultats.

III. Plasticité et approches pharmacologiques

L'ensemble de ces altérations qui se répercutent aux niveaux ioniques et vasculaires entraînent une perte de la capacité du vaisseau à réguler le débit sanguin cérébral dans la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion cérébrale. Ces altérations qui sont concomitantes aux lésions du tissu cérébral localisées dans la zone infarctée sont reflétées expérimentalement par la diminution systématique à la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion des performances motrices et sensorimotrices des animaux pour les différents tests comportementaux utilisés. Une évolution spontanée des différentes fonctions étudiées, similaires à la récupération observée chez l'homme suite à un accident vasculaire cérébral, est mise en évidence sous tendant la notion de plasticité opérante au niveau des différents compartiments étudiés, qui sont susceptibles d'être prévenues ou accélérées par les différentes approches pharmacologiques utilisées.

III.A. Plasticité ionique et stratégies pharmacologiques

L'évolution spontanée de la densité de courant Kir2.x, se traduit par la récupération progressive et totale à 7 jours de reperfusion correspondant à la phase subaiguë du processus d'ischémie reperfusion cérébrale, et pourrait être expliquée par un retour progressif du statut d'oxydoréduction des protéines canalaire. L'état redox des cellules, défini par l'équilibre entre les molécules pro-oxydantes et les défenses antioxydantes, évolue irrémédiablement au cours du temps en s'orientant vers un retour des états oxydés à l'état réduit favorisant au moins en partie, le rétablissement des résidus lysines et méthionines oxydées prépondérantes dans les protéines constituant les canaux ioniques. Une autre hypothèse résidait dans une plus faible expression de canaux exprimés à la surface

membranaire suite à l'ischémie reperfusion. Afin de tester cette hypothèse nous avons réalisé des expériences de western-blot sur des artères cérébrales ischémiées versus des artères cérébrales SHAM. Cependant, la très faible quantité de tissu disponible et le manque de spécificité des anticorps dirigés contre les isoformes Kir2.1 ont rendu cette étude infructueuse. Cette hypothèse reste cependant une possibilité qui pourrait expliquer la réduction de la densité de courant, la récupération du courant ionique pouvant être sous-tendue par une synthèse de novo qui participerait au renouvellement effectif des protéines transmembranaires. Une étude réalisée sur la cellule gliale a en effet montré l'implication d'un tel mécanisme dans la récupération de l'amplitude du courant Kir glial altéré en phase post-ischémique (Koller *et coll*, 2000). Ces récupérations progressives au cours du temps dénotent une plasticité ionique, c'est-à-dire la capacité des systèmes ioniques à récupérer leurs fonctions initiales au cours du temps.

L'administration d'un agent antioxydant tel que la Stobadine à la phase aiguë de l'ischémie reperfusion, a confirmé l'effet bénéfique des agents antioxydants déjà révélés au laboratoire avec l'administration d'un composé flavonique (3',5'-di-tert-butylhydroxyphényl chalcone, dt-BC) (Petrault *et coll*, 2004). Ils permettent de protéger la fonction musculaire lisse Kir2.x-dépendante en termes de restauration de densité de courant. Cette protection de la densité de courant Kir2.x peut être sous-tendue par un mécanisme direct de neutralisation des radicaux libres stoppant ainsi l'initiation des mécanismes délétères tels que l'oxydation des membranes (perte de la fluidité membranaire par peroxydation lipidique) et des protéines formant les canaux membranaires.

Cette notion de plasticité n'a pas pu être explorée, ce qui concerne la conductance Kv. Les résultats ont été obtenus seulement à 24 heures de reperfusion. Cette étude devra être poursuivie afin de suivre l'évolution de cette altération au cours de la période subaiguë comme il l'a été fait pour le courant Kir2.x.

III.B. Plasticité vasculaire et stratégies pharmacologiques

Les répercussions du processus d'ischémie reperfusion cérébrale affectent le compartiment vasculaire qui présente spontanément lui aussi une aptitude à récupérer au cours du temps. De manière concomitante à la restauration progressive de la densité de courant Kir2.x, la relaxation potassium dépendante qui lui est associée évolue elle aussi vers une récupération totale à 7 jours. En parallèle est observée une restauration du tonus myogénique et de la réponse contractile à la sérotonine. En revanche, l'altération du diamètre de repos persiste sur la période de 7 jours. La réponse myogénique étant fortement dépendante

de l'activation des canaux potassiques, le stress oxydant peut être responsable de son altération et le délai de 7 jours nécessaire à sa récupération peut être lié au retour à un état redox des canaux Kv. Cependant, alors qu'une protection de la relaxation musculaire lisse potassium-dépendante était observée suite à l'effet de la dt-BC, la Stobadine ne permet pas d'accélérer la récupération de la fonction en phase subaiguë. En revanche le diamètre de repos revient à une valeur normale correspondant à un tonus musculaire de base permettant de retrouver des possibilités de contrôle physiologique du diamètre des vaisseaux.

L'évolution spontanée de la dysfonction endothéliale ne présente aucune récupération en phase aiguë et subaiguë s'étendant dans notre étude jusqu'à 7 jours de reperfusion. La protection de cette dysfonction dès 24 heures de reperfusion par le traitement à la Stobadine montre ici tout le bénéfice de la stratégie antioxydante à la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion. Cette prévention sous tendant une cinétique d'action rapide de la Stobadine doit avant tout être expliquée par sa capacité de neutralisation des effets délétères des espèces activées de l'oxygène, passant notamment par la production de l'anion superoxyde par les neutrophiles lors de la phase de reperfusion (Guzik *et coll*, 2002). La Stobadine montrant une affinité supérieure pour l'anion superoxyde que le NO, empêche la production de peroxynitrite et permet le rétablissement de la biodisponibilité du NO à la phase aiguë. L'autre action potentiellement bénéfique de la Stobadine sur le compartiment endothélial réside dans la structure elle-même du compartiment endothélial par ses propriétés démontrées de protection membranaire et par l'induction des mécanismes de prolifération des cellules endothéliales en phase post-ischémique susceptible de réparer les conséquences physiques post-ischémiques (Franko *et coll*, 1999; Sotnikova *et coll*, 1998). Un processus similaire a été décrit dans l'effet protecteur neurovasculaire de l'érythropoïétine. L'administration de cette substance suite à l'ischémie reperfusion stimule la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse permettant de ce fait une restauration du débit sanguin cérébral (Li *et coll*, 2007).

Nos données expérimentales relatives à l'administration post-ischémique de fénofibrate montrent une accélération de la récupération de la relaxation endothélium-dépendante. Cet effet significativement bénéfique par rapport à la cinétique d'évolution spontanée, mais plus tardif par rapport à la prévention de l'altération réalisée par la Stobadine peut être expliquée par le mode d'administration par gavage et par sa faible capacité à franchir la barrière hématoencéphalique. Cette accélération de la récupération observée de façon concomitante à l'activation des récepteurs nucléaires PPAR- α , pourrait être le résultat de l'inhibition des processus inflammatoires et de l'inhibition de l'adhésion leucocytaire.

Effectivement, en plus de leur potentiel antioxydant, les récepteurs PPAR- α limitent l'induction d'ICAM-1 et de VCAM-1 au décours de l'ischémie cérébrale via la trans-répression du facteur NF-KB et pourrait agir favorablement quant à la récupération de la fonction vasculaire correspondante. L'activation de ces récepteurs nucléaires inhiberait aussi l'expression des métalloprotéinases en phase post-ischémique (Deplanque *et coll*, 2003; Pereira *et coll*, 2005). Une autre voie possible de la protection induite par le fénofibrate est la régulation de la production de molécules vasoconstrictrices telles que l'endothéline-1 (Delerive *et coll*, 1999). Enfin, l'activation de ces récepteurs est susceptible de conduire à une activation cellulaire amenant à une régénération endothéliale bénéfique en phase post-ischémique, démontrée dans d'autres territoires artériels (Tanaka *et coll*, 2005).

Ces mécanismes d'activations cellulaires retrouvées dans les effets bénéfiques des traitements par la Stobadine et par le Fénofibrate ne se limitent pas au compartiment endothélial. Ils peuvent ainsi favoriser voire accélérer, par l'amélioration entre autre des fonctions vasculaires observées dans ces deux approches pharmacologiques, les mécanismes spontanés d'angiogénèse et de neurogenèse de réparation du tissu cérébral qui se mettent en place progressivement en période post-ischémique (Li *et coll*, 2007).

III.C. Plasticité cérébrale et stratégies pharmacologiques

Comme cela a déjà été évoqué, le processus d'ischémie reperfusion provoque la formation de lésions cérébrales par des processus nécrotiques et apoptotiques qui affectent tant le niveau cortical que sous cortical. Ces altérations des structures cérébrales amènent à une atteinte des réseaux nerveux moteurs et sensorimoteurs abordés précédemment, reflétée par la diminution des performances des animaux pour l'ensemble des tests utilisés à la phase aiguë, qui permettent la mise en relation des différentes fonctions sensitives et motrices entre le niveau cérébral et le niveau périphérique constitué respectivement des récepteurs sensoriels et des muscles squelettiques. L'apparition simultanée d'un œdème cérébral vient d'autant plus majorer l'ensemble de ces lésions, celui-ci constituant l'une des causes cliniques majeures de détérioration et d'aggravation des déficits neurologiques (Ayata *et coll*, 2002). Notre étude avait comme objectif d'évaluer simultanément à la quantification des volumes d'infarctus et d'œdème, l'impact du processus d'ischémie reperfusion cérébrale sur le comportement moteur et sensorimoteur des animaux à la phase aiguë et subaiguë de l'ischémie et de pouvoir effectuer par la suite une évaluation bénéfique de traitements pharmacologiques neuroprotecteurs.

Nos observations, bien que limitées à une période subaiguë de 7 jours de reperfusion, montrent sous la forme d'une évolution spontanée, une faible diminution des volumes d'infarctus sauf au niveau sous cortical et de l'œdème où une réduction significative est observée. Les déficits comportementaux observés dans cette même période d'étude montraient un schéma de récupération identique pour l'ensemble des tests sensorimoteurs utilisés sans que les animaux puissent retrouver toutefois leurs performances initiales. Ces résultats laissent supposer que les animaux doivent être suivis sur un temps d'étude plus long (plusieurs semaines) afin d'observer si une réduction spontanée globale des lésions cérébrales et comportementales est possible. Dans ce sens, il a été montré dans le même modèle d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne chez le rat, une persistance du déficit fonctionnel par le test du ruban adhésif jusqu'à 10 semaines de reperfusion susceptible d'être amélioré par l'administration de déféroxamine qui est un chélateur du fer (Freret *et coll*, 2006).

Cette évolution spontanée de la majorité des fonctions étudiées chez le rat soutient la notion de plasticité cérébrale qui s'instaure en période post-ischémique de façon similaire à ce qui est observé au stade clinique chez l'homme. Cette plasticité cérébrale englobe un ensemble de mécanismes bénéfiques qui découlent de processus neurobiologiques. L'accident ischémique active en effet une multitude de mécanismes au sein du tissu neuroglivovasculaire. La formation de nouveaux vaisseaux cérébraux, l'activation des cellules gliales de manière concomitante à la restructuration des prolongements dendritiques des neurones, la stimulation de la neurogenèse et de la synaptogenèse vont se mettre en place de manière simultanée. De nouvelles connexions nerveuses vont se constituer permettant un retour progressif des fonctions neurologiques reflétées par l'évolution spontanée observée dans les tests comportementaux (Briones *et coll*, 2004). La neurogenèse semble pouvoir être initiée à différentes régions cérébrales suite à l'accident ischémique consistant en un remplacement des cellules nerveuses à partir de précurseurs endogènes. Elle est permise par la surexpression de facteurs mitogéniques et de facteurs de croissance stimulant le recrutement de cellules souches en neuroblastes dans des zones cérébrales bien ciblées telle la zone sous ventriculaire. Dans ce cas, les neuroblastes, cellules amenées à devenir les futurs neurones, migrent alors vers la région infarctée localisée spécifiquement au niveau sous cortical afin de réparer le tissu affecté (Arvidsson *et coll*, 2002). De façon concomitante à ce mécanisme de réparation s'instaurant spécifiquement au niveau sous cortical, il est montré au niveau cortical que deux jours après l'accident ischémique survient la formation de cellules nerveuses issues d'une neurogenèse endogène localisée au site de la lésion plutôt que d'une migration de

cellules provenant de zones distantes telle la zone sous ventriculaire retrouvée notamment dans le cas sous cortical. Cette neurogenèse localisée a été mise en évidence dans différentes régions corticales incluant le cortex visuel chez le rat adulte ainsi que le néocortex chez le rongeur et le primate (Shin *et coll*, 2008). Cette réorganisation du tissu nerveux est accompagnée de la formation de nouveaux vaisseaux au niveau de la zone de pénombre ischémique assurant via l'établissement d'un débit sanguin cérébral les mécanismes de plasticité. Celle-ci ne se limite pas à la région bordant la zone infarctée. Des études de neuro-imagerie indiquent en effet des changements de profil d'activité des fonctions motrices et sensorimotrices situées au niveau de l'hémisphère cérébral contralatéral à l'ischémie concomitants à un remodelage du profil somatotopique de l'homunculus sensitif chez les patients (Rossini *et coll*, 2003). En parallèle se produisent des changements de la densité de récepteurs au glutamate et au GABA (Jolkkonen *et coll*, 2003) ainsi qu'une augmentation de la densité de courants calciques au niveau des neurones situés dans les aires corticales sensorielles contralatérales jusqu'à 28 jours en période post-ischémique qui participent aux mécanismes de compensation impliquant l'hémisphère non infarcté (Bruehl *et coll*, 2000).

L'évaluation comportementale réalisée sur les animaux traités par la Stobadine a mis en évidence que les effets neuroprotecteurs et vasculoprotecteurs de cet agent antioxydant se traduisaient par une accélération significative de la récupération fonctionnelle spontanée. Suite aux propriétés vasculo et neuroprotectrices du Fénofibrate décrites précédemment à 72 heures de reperfusion au laboratoire (Ouk *et coll*, 2005), une évaluation comportementale a été réalisée dans le but de déterminer si des effets favorables similaires à ceux de la Stobadine étaient retrouvés au niveau du déficit moteur (test du rotarod). Les traitements par la Stobadine et par le Fénofibrate montrent des effets bénéfiques indéniables sur l'accélération de la diminution des lésions cérébrales ainsi que sur la récupération des déficits fonctionnels. Toutefois, des disparités d'effets sur le tissu nerveux apparaissent pouvant être en partie expliquées par leurs différences d'action et leur mode d'administration aux animaux.

Le traitement par la Stobadine permet une réduction des volumes d'infarctus et de l'œdème dès la phase aiguë du processus d'ischémie reperfusion. En plus de son effet vasculoprotecteur décrit précédemment, la Stobadine mène son action bénéfique au niveau du tissu cérébral par sa capacité à pouvoir traverser rapidement et efficacement la barrière hémato-encéphalique. Suite à son injection en intraveineuse, la Stobadine est en effet retrouvée dans un délai rapide de 5 minutes au sein du tissu nerveux où elle possède la propriété de traverser simultanément les compartiments cellulaires hydrophiles et

hydrophobes. Elle possède en plus de ses propriétés antioxydantes déjà décrites, celle d'assurer l'intégrité des membranes cellulaires du tissu neuroglial mais aussi des compartiments intracellulaires tels que les membranes du réticulum endoplasmique et des mitochondries. Ces différentes propriétés bénéfiques permettent d'induire une neuroprotection dans la mesure où ces composants cellulaires interviennent précisément dans les processus de mort cellulaire initiés dans les premiers instants de l'ischémie (Stolc *et coll*, 1997). Ces résultats sont confirmés par les effets de différents traitements tels la curcumine, contenant des pigments polyphénoliques aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Wu *et coll*, 2006), mais aussi de la vitamine E et de l'acide α lipoïque qui agissent de façon synergique contre la peroxydation lipidique initiée par le stress oxydant (Gonzalez-Perez *et coll*, 2002). Les bénéfices de ces différentes stratégies permettent la réduction des conséquences de l'ischémie sur le tissu neuro-glial et favorisent les mécanismes de plasticité cérébrale par le développement des prolongements nerveux et de la synaptogenèse ainsi que par la diminution de l'activation néfaste des cellules gliales. De façon parallèle à ces effets bénéfiques sur les lésions cérébrales, une accélération de la récupération des performances motrices et sensorimotrices est observée suite au traitement par la Stobadine. Cette accélération peut être reliée à la diminution significative des lésions cérébrales (infarctus sous-cortical et œdème) observée à 3 jours de reperfusion chez les animaux traités. Il est en effet montré que la localisation sous-corticale de la lésion ischémique apparaît être déterminante sur les conséquences sensorimotrices suite à l'induction de l'ischémie cérébrale focale (Zhang *et coll*, 2002). Cette observation peut être reliée aux traitements par la Stobadine et par le Fénofibrate à leur capacité à diminuer de façon progressive et significative le volume d'infarctus sous-cortical à 3 jours et 7 jours de reperfusion dans la phase subaiguë.

Le même profil de réduction des lésions cérébrales est retrouvé suite au traitement par le Fénofibrate à 3 jours de reperfusion. Cependant, alors que la Stobadine montre un effet neuroprotecteur dès 24 heures de reperfusion, le Fénofibrate ne semble pas agir aussi rapidement. Son mode d'administration par gavage le conduit tout d'abord à être assimilé puis hydrolysé rapidement par des estérases plasmatiques et tissulaires en acide fénofibrique constituant la forme circulante active du composé. Sa faible capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique peuvent en premier lieu expliquer ce retard dans l'apparition des effets. Il possède des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, ces dernières n'étant vraisemblablement pas retrouvées avec la Stobadine. L'effet antioxydant peut dans ce cas être qualifié d'indirect comparé à celui délivré par la Stobadine dans la mesure où son action via

les récepteurs PPAR α est associé à une activation d'enzymes antioxydantes telles que la Cu/Zn superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase (Deplanque *et coll*, 2003). Ses effets neuroprotecteurs semblent aussi liés à la diminution de l'expression de marqueurs inflammatoires retrouvés au niveau du tissu cérébral tels que l'interleukine-1 β et la NOS inducible (Bordet *et coll*, 2006). Ces deux effets bénéfiques semblent de plus liés dans la mesure où la diminution de l'activation de la COX-2 résulterait indirectement de la diminution du stress oxydant induit par le Fénofibrate (Zhao *et coll*, 2006). Les différentes étapes passant par la trans-activation et la trans-répression génique, qui ne semble pas être retrouvées avec la Stobadine peuvent expliquer en second lieu les effets bénéfiques retardés du Fénofibrate vis-à-vis de ceux de la Stobadine retrouvés quant à eux dès la phase aiguë de l'ischémie.

Seule la réduction de l'œdème à la phase subaiguë n'est pas retrouvée dans le traitement par le Fénofibrate. Cette différence pourrait expliquer que l'accélération des performances comportementales bien qu'effective au niveau du test du rotarod, ne semble pas aussi efficace au niveau du test sensorimoteur du ruban adhésif. Effectivement, une étude a montré le rôle particulièrement néfaste exercé par l'œdème dans l'évaluation neurologique et dans l'exécution de tâches motrices au cours du temps dans un modèle similaire d'ischémie reperfusion cérébrale (Vannucchi *et coll*, 2007).

Les effets bénéfiques du Fénofibrate et de la Stobadine sur l'amélioration des déficits fonctionnels peuvent être rapprochés d'autres études qui montrent les mêmes bénéfices conduisant à la réparation progressive du tissu cérébral par la stimulation de la neurogenèse et de l'angiogénèse. La relation entre effet neuroprotecteur et vasculoprotecteur a été retrouvée avec d'autres traitements pharmacologiques. L'érythropoïétine (EPO) intervient en effet en condition normale dans le développement cérébral et dans la régulation de la neurogenèse chez la souris. L'accident cérébral stimule la production d'EPO et de son récepteur en agissant simultanément avec le BDNF et le VEGF pour venir stimuler la neurogenèse et l'angiogénèse et favoriser la récupération fonctionnelle (Wang *et coll*, 2004). L'angiogénèse peut également être stimulée par un traitement par le sildénafil, inhibiteur sélectif des phosphodiésterases de type 5, en induisant une augmentation de la formation de vaisseaux cérébraux du côté ipsilatéral à l'ischémie. Cette activation de l'angiogénèse, permet sur le long terme une meilleure perfusion de la région correspondant à la pénombre ischémique menant à une augmentation significative du débit sanguin cérébral se prolongeant jusqu'à la sixième semaine en période post-ischémique, concomitante à une amélioration des déficits fonctionnels (Li *et coll*, 2007).

La durée de notre étude concernant les effets de la Stobadine et du Fénofibrate devra être prolongée sur plusieurs semaines car il ressort des travaux précédemment cités de Wang et coll (2004) et Li et coll (2007) que l'effet bénéfique des traitements appliqués est de plus en plus significatif au fil des semaines car visiblement corrélé à l'amélioration progressive du débit sanguin cérébral dans la zone de pénombre. La neurogenèse et l'angiogenèse devront être évaluées dans le cadre de ces deux traitements afin de vérifier cette hypothèse. Celle-ci semble d'autant plus pertinente qu'il a été montré que l'activation sélective des récepteurs PPAR α et PPAR γ induit une néoangiogenèse via une activation indirecte par la cytokine angiogénique VEGF (Biscetti *et coll*, 2008).

IV. Conclusion et perspectives

L'ensemble de nos travaux permet d'apporter de nouvelles informations sur les altérations ioniques du muscle lisse vasculaire cérébral qui apparaissent suite à l'ischémie reperfusion. Ces altérations sont très précoces puisque dès 24 heures de reperfusion les conductances potassiques de type Kir2.x et Kv sont très significativement réduites ce qui va contribuer lors de la reperfusion à un défaut de régulation du débit sanguin cérébral qui pourra contribuer à l'extension des lésions. Ces altérations ioniques au moins en ce qui concerne la conductance Kir2.x se restaure spontanément et progressivement au cours d'une période assez courte de 7 jours. Cette récupération s'accompagne d'une amélioration de la majeure partie des fonctions mécaniques du muscle lisse qui sont fortement dépendantes du potentiel de membrane et donc des canaux potassiques. Il serait nécessaire de déterminer si la restauration de la conductance Kv suivrait le même décours temporel que celle de la conductance Kir2.x. Le cas de cette conductance est particulièrement intéressant puisque pour la première fois nous avons mis en évidence une potentialisation de l'altération de la conductance Kv par le NO, élément fortement perturbé au décours de l'ischémie reperfusion avec des conséquences à la fois bénéfiques et délétères. Cette régulation des canaux Kv par le NO ouvre de nouvelles perspectives d'étude et nécessitera d'être approfondie.

En parallèle de ces altérations ioniques, nous avons confirmé (i) les déficits au niveau de la capacité de relaxation de l'artère cérébrale moyenne dépendante du muscle lisse. Ces altérations sont soumises à une plasticité puisque de manière concomitante à la restauration des canaux Kir2.x cette relaxation récupère spontanément ainsi que le tonus myogénique; (ii) les déficits fonctionnels moteurs et sensorimoteurs présents à 24h de reperfusion ainsi que les conséquences des lésions cérébrales. Au cours de la période subaigüe, simultanément à la récupération musculaire lisse, s'observe une diminution lente mais significative de ces déficits fonctionnels. Même si le lien direct entre amélioration du débit sanguin cérébral et récupération fonctionnelle est un peu audacieux, cette voie offre de nombreuses perspectives à explorer. Ainsi, les stratégies pharmacologiques utilisées ici, administration à la phase aigüe de Stobadine ou de Fénofibrate, vont l'une et l'autre améliorer ou protéger la paroi vasculaire des altérations post-ischémiques en particulier au niveau de l'endothélium et en parallèle accélérer la récupération fonctionnelle observée spontanément. Ces différentes approches pharmacologiques envisagées dans ce travail, susceptibles d'agir positivement sur cette plasticité, montrent que l'inhibition du stress oxydant, la modulation des voies vasoactives et la diminution des médiateurs de l'inflammation, représentent expérimentalement des cibles

pertinentes dans le développement d'une neuroprotection au décours du processus d'ischémie reperfusion cérébrale et qu'une partie de ces effets peut être due à la protection de l'homéostasie ionique vasculaire de manière précoce.

Ce travail devra se poursuivre en étudiant l'évolution sur une période de plusieurs semaines voire de plusieurs mois des différents paramètres étudiés ici dans le but d'observer si une récupération fonctionnelle totale peut-être finalement effective. Il faudra approfondir nos connaissances de l'implication des canaux ioniques musculaires et procéder à une extension au niveau du compartiment neuro-glial en raison des interactions complexes existant entre myocytes vasculaires, astrocytes et neurones. La multiplicité des conséquences de l'ischémie nécessite une meilleure connaissance des mécanismes délétères se produisant à chaque échelon cellulaire afin de permettre la découverte de nouvelles cibles pouvant déboucher vers des voies thérapeutiques plus adaptées et plus efficaces.

Références

bibliographiques

Akata, T. (2007). "Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone." *J Anesth* 21(2): 220-31.

Akata, T. (2007). "Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells." *J Anesth* 21(2): 232-42.

Amberg, G. C. et L. F. Santana (2006). "Kv2 channels oppose myogenic constriction of rat cerebral arteries." *Am J Physiol Cell Physiol* 291(2): C348-56.

Andresen, J., N. I. Shafi et R. M. Bryan, Jr. (2006). "Endothelial influences on cerebrovascular tone." *J Appl Physiol* 100(1): 318-27.

Annunziato, L., A. Pannaccione, M. Cataldi, A. Secondo, P. Castaldo, G. Di Renzo et M. Tagliatela (2002). "Modulation of ion channels by reactive oxygen and nitrogen species: a pathophysiological role in brain aging?" *Neurobiol Aging* 23(5): 819-34.

Arvidsson, A., T. Collin, D. Kirik, Z. Kokaia et O. Lindvall (2002). "Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke." *Nat Med* 8(9): 963-70.

Ayata, C. et A. H. Ropper (2002). "Ischaemic brain oedema." *J Clin Neurosci* 9(2): 113-24.

Banan, A., J. Z. Fields, Y. Zhang et A. Keshavarzian (2001). "iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280(6): G1234-46.

Baron, J. C. (1999). "Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment." *Cerebrovasc Dis* 9(4): 193-201.

Bastide, M., R. Bordet, Q. Pu, E. Robin, F. Puisieux et B. Dupuis (1999). "Relationship between inward rectifier potassium current impairment and brain injury after cerebral ischemia/reperfusion." *J Cereb Blood Flow Metab* 19(12): 1309-15.

Bastide, M., P. Gele, O. Petrault, Q. Pu, A. Caliez, E. Robin, D. Deplanque, P. Duriez et R. Bordet (2003). "Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide in parallel to brain ischemic tolerance." *J Cereb Blood Flow Metab* 23(4): 399-405.

Bastide, M., T. Ouk, F. Plaisier, O. Petrault, S. Stolc et R. Bordet (2007). "Neurogliovascular unit after cerebral ischemia: is the vascular wall a pharmacological target." *Psychoneuroendocrinology* 32 Suppl 1: S36-9.

Bear, M. F., B. W. Connors et M. A. Paradiso (2002). *Neurosciences, à la découverte du cerveau*, 2ème édition.

Bejot, Y., I. Benatru, O. Rouaud, A. Fromont, J. P. Besancenot, T. Moreau et M. Giroud (2007). "Epidemiology of stroke in Europe: geographic and environmental differences." *J Neurol Sci* 262(1-2): 85-8.

Benchoua, A., C. Guegan, C. Couriaud, H. Hosseini, N. Sampaio, D. Morin et B. Onteniente (2001). "Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction." *J Neurosci* 21(18): 7127-34.

Betz, A. L., R. F. Keep, M. E. Beer et X. D. Ren (1994). "Blood-brain barrier permeability and brain concentration of sodium, potassium, and chloride during focal ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* 14(1): 29-37.

Biscetti, F., E. Gaetani, A. Flex, T. Aprahamian, T. Hopkins, G. Straface, G. Pecorini, E. Stigliano, R. C. Smith, F. Angelini, J. J. Castellot, Jr. et R. Pola (2008). "Selective activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPAR gamma induces neoangiogenesis through a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism." *Diabetes* 57(5): 1394-404.

Bishop-Bailey, D. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system." *Br J Pharmacol* 129(5): 823-34.

Blondeau, N., O. Petrault, S. Manta, V. Giordanengo, P. Gounon, R. Bordet, M. Lazdunski et C. Heurteaux (2007). "Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel." *Circ Res* 101(2): 176-84.

Bogatcheva, N. V., M. G. Sergeeva, S. M. Dudek et A. D. Verin (2005). "Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology." *Microvasc Res* 69(3): 107-27.

Bogousslavsky, J., S. Garazi, X. Jeanrenaud, N. Aebischer et G. Van Melle (1996). "Stroke recurrence in patients with patent foramen ovale: the Lausanne Study. Lausanne Stroke with Paradoxal Embolism Study Group." *Neurology* 46(5): 1301-5.

Bogousslavsky, J. et F. Regli (1986). "Unilateral watershed cerebral infarcts." *Neurology* 36(3): 373-7.

Bolotina, V. M., S. Najibi, J. J. Palacino, P. J. Pagano et R. A. Cohen (1994). "Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle." *Nature* 368(6474): 850-3.

Bordet, R., D. Deplanque, P. Maboudou, F. Puisieux, Q. Pu, E. Robin, A. Martin, M. Bastide, D. Leys, M. Lhermitte et B. Dupuis (2000). "Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance." *J Cereb Blood Flow Metab* 20(8): 1190-6.

Bordet, R., T. Ouk, O. Petrault, P. Gele, S. Gautier, M. Laprais, D. Deplanque, P. Duriez, B. Staels, J. C. Fruchart et M. Bastide (2006). "PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases." *Biochem Soc Trans* 34(Pt 6): 1341-6.

Brayden, J. E., S. Earley, M. T. Nelson et S. Reading (2008). "Transient Receptor Potential (Trp) Channels, Vascular Tone And Autoregulation Of Cerebral Blood Flow." *Clin Exp Pharmacol Physiol*.

- Briones, T. L., E. Suh, L. Jozsa, H. Hattar, J. Chai et M. Wadowska (2004). "Behaviorally-induced ultrastructural plasticity in the hippocampal region after cerebral ischemia." *Brain Res* 997(2): 137-46.
- Broderick, J. P., S. J. Phillips, J. P. Whisnant, W. M. O'Fallon et E. J. Bergstralh (1989). "Incidence rates of stroke in the eighties: the end of the decline in stroke?" *Stroke* 20(5): 577-82.
- Browner, N. C., H. Sellak et T. M. Lincoln (2004). "Downregulation of cGMP-dependent protein kinase expression by inflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 287(1): C88-96.
- Bruehl, C., T. Neumann-Haefelin et O. W. Witte (2000). "Enhancement of whole cell calcium currents following transient MCAO." *Brain Res* 884(1--2): 129-38.
- Bryan, R. M., Jr., B. K. Joseph, E. Lloyd et N. J. Rusch (2007). "Starring TREK-1: the next generation of vascular K⁺ channels." *Circ Res* 101(2): 119-21.
- Bryan, R. M., Jr., J. You, S. C. Phillips, J. J. Andresen, E. E. Lloyd, P. A. Rogers, S. E. Dryer et S. P. Marrelli (2006). "Evidence for two-pore domain potassium channels in rat cerebral arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(2): H770-80.
- Brzezinska, A. K., D. Gebremedhin, W. M. Chilian, B. Kalyanaraman et S. J. Elliott (2000). "Peroxyntirite reversibly inhibits Ca(2+)-activated K(+) channels in rat cerebral artery smooth muscle cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(6): H1883-90.
- Brzezinska, A. K., N. Lohr et W. M. Chilian (2005). "Electrophysiological effects of O₂⁻ on the plasma membrane in vascular endothelial cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(6): H2379-86.
- Buerk, D. G., D. N. Atochin et C. E. Riva (2003). "Investigating the role of nitric oxide in regulating blood flow and oxygen delivery from in vivo electrochemical measurements in eye and brain." *Adv Exp Med Biol* 530: 359-70.
- Busija, D. W. et D. D. Heistad (1984). "Factors involved in the physiological regulation of the cerebral circulation." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 101: 161-211.
- Butt, A. M. et A. Kalsi (2006). "Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions." *J Cell Mol Med* 10(1): 33-44.
- Cai, H. et D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." *Circ Res* 87(10): 840-4.
- Campbell, W. B. et J. R. Falck (2007). "Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors." *Hypertension* 49(3): 590-6.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nat Med* 6(4): 389-95.

Castilla Guerra, L., M. del Carmen Fernandez Moreno, J. M. Lopez Chozas et M. D. Jimenez Hernandez (2008). "Statins in stroke prevention: what an internist should know." *Eur J Intern Med* 19(1): 8-14.

Cecchelli, R., V. Berezowski, S. Lundquist, M. Culot, M. Renftel, M. P. Dehouck et L. Fenart (2007). "Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development." *Nat Rev Drug Discov* 6(8): 650-61.

Chan, P. H. (2001). "Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain." *J Cereb Blood Flow Metab* 21(1): 2-14.

Chan, S. L., C. Capdeville-Atkinson et J. Atkinson (2008). "Red wine polyphenols improve endothelium-dependent dilation in rat cerebral arterioles." *J Cardiovasc Pharmacol* 51(6): 553-8.

Chan, S. L., A. Tabellion, D. Bagrel, C. Perrin-Sarrado, C. Capdeville-Atkinson et J. Atkinson (2008). "Impact of chronic treatment with red wine polyphenols (RWP) on cerebral arterioles in the spontaneous hypertensive rat." *J Cardiovasc Pharmacol* 51(3): 304-10.

Charriaut-Marlangue, C., I. Margail, A. Represa, T. Popovici, M. Plotkine et Y. Ben-Ari (1996). "Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis." *J Cereb Blood Flow Metab* 16(2): 186-94.

Chen, J., Y. Li, L. Wang, M. Lu, X. Zhang et M. Chopp (2001). "Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats." *J Neurol Sci* 189(1-2): 49-57.

Chen, T. T., K. D. Luykenaar, E. J. Walsh, M. P. Walsh et W. C. Cole (2006). "Key role of Kv1 channels in vasoregulation." *Circ Res* 99(1): 53-60.

Chrissobolis, S. et C. G. Sobey (2006). "Recent evidence for an involvement of rho-kinase in cerebral vascular disease." *Stroke* 37(8): 2174-80.

Cipolla, M. J. et L. V. Bullinger (2008). "Reactivity of Brain Parenchymal Arterioles after Ischemia and Reperfusion." *Microcirculation*: 1.

Cipolla, M. J. et A. B. Curry (2002). "Middle cerebral artery function after stroke: the threshold duration of reperfusion for myogenic activity." *Stroke* 33(8): 2094-9.

Cipolla, M. J., R. Li et L. Vitullo (2004). "Perivascular innervation of penetrating brain parenchymal arterioles." *J Cardiovasc Pharmacol* 44(1): 1-8.

Cipolla, M. J., A. L. McCall, N. Lessov et J. M. Porter (1997). "Reperfusion decreases myogenic reactivity and alters middle cerebral artery function after focal cerebral ischemia in rats." *Stroke* 28(1): 176-80.

Cipolla, M. J. et G. Osol (1998). "Vascular smooth muscle actin cytoskeleton in cerebral artery forced dilatation." *Stroke* 29(6): 1223-8.

Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." *Nature* 426(6966): 517-24.

Cohen, Z., G. Molinatti et E. Hamel (1997). "Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex." *J Cereb Blood Flow Metab* 17(8): 894-904.

Collins, R. C., B. H. Dobkin et D. W. Choi (1989). "Selective vulnerability of the brain: new insights into the pathophysiology of stroke." *Ann Intern Med* 110(12): 992-1000.

Cook, D. A. (1995). "Mechanisms of cerebral vasospasm in subarachnoid haemorrhage." *Pharmacol Ther* 66(2): 259-84.

Copin, J. C. et Y. Gasche (2003). "[Morphology and physiology of the blood-brain barrier]." *Ann Fr Anesth Reanim* 22(3): 202-14.

Cullingford, T. E., K. Bhakoo, S. Peuchen, C. T. Dolphin, R. Patel et J. B. Clark (1998). "Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system." *J Neurochem* 70(4): 1366-75.

Dahlof, B. (2007). "Prevention of stroke in patients with hypertension." *Am J Cardiol* 100(3A): 17J-24J.

Dai, Y. et J. Zhang (2004). "Chloride Efflux is Involved in ET-1 and 5-HT-Induced Contraction in Rabbit Basilar Artery." *J Cardiovasc Pharmacol* 44: S125-S128.

Dehouck, M. P., R. Cecchelli, A. Richard Green, M. Renftel et S. Lundquist (2002). "In vitro blood-brain barrier permeability and cerebral endothelial cell uptake of the neuroprotective nitro compound NXY-059 in normoxic, hypoxic and ischemic conditions." *Brain Res* 955(1-2): 229-35.

del Zoppo, G. J. et T. Mabuchi (2003). "Cerebral microvessel responses to focal ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* 23(8): 879-94.

del Zoppo, G. J., G. W. Schmid-Schonbein, E. Mori, B. R. Copeland et C. M. Chang (1991). "Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons." *Stroke* 22(10): 1276-83.

Delerive, P., F. Martin-Nizard, G. Chinetti, F. Trottein, J. C. Fruchart, J. Najib, P. Duriez et B. Staels (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway." *Circ Res* 85(5): 394-402.

Deplanque, D., P. Gele, O. Petrault, I. Six, C. Furman, M. Bouly, S. Nion, B. Dupuis, D. Leys, J. C. Fruchart, R. Cecchelli, B. Staels, P. Duriez et R. Bordet (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment." *J Neurosci* 23(15): 6264-71.

Deplanque, D., I. Masse, C. Lefebvre, C. Libersa, D. Leys et R. Bordet (2006). "Prior TIA, lipid-lowering drug use, and physical activity decrease ischemic stroke severity." *Neurology* 67(8): 1403-10.

- Di Filippo, M., A. Tozzi, C. Costa, V. Belcastro, M. Tantucci, B. Picconi et P. Calabresi (2008). "Plasticity and repair in the post-ischemic brain." *Neuropharmacology*.
- Dirnagl, U., C. Iadecola et M. A. Moskowitz (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." *Trends Neurosci* 22(9): 391-7.
- Dong, W., N. Li, D. Gao, H. Zhen, X. Zhang et F. Li (2008). "Resveratrol attenuates ischemic brain damage in the delayed phase after stroke and induces messenger RNA and protein express for angiogenic factors." *J Vasc Surg* 48(3): 709-14.
- Donnan, G. A., M. Fisher, M. Macleod et S. M. Davis (2008). "Stroke." *Lancet* 371(9624): 1612-23.
- Edwards, G. et A. H. Weston (2004). "Potassium and potassium currents in endothelium-dependent hyperpolarizations." *Pharmacol Res* 49(6): 535-41.
- Ernst, C. et B. R. Christie (2006). "Temporally specific proliferation events are induced in the hippocampus following acute focal injury." *J Neurosci Res* 83(3): 349-61.
- Eto, M., T. Ohmori, M. Suzuki, K. Furuya et F. Morita (1995). "A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization." *J Biochem* 118(6): 1104-7.
- Faraci, F. M. et C. G. Sobey (1998). "Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone." *J Cereb Blood Flow Metab* 18(10): 1047-63.
- Figuroa, X. F., B. E. Isakson et B. R. Duling (2004). "Connexins: gaps in our knowledge of vascular function." *Physiology (Bethesda)* 19: 277-84.
- Filosa, J. A. et V. M. Blanco (2007). "Neurovascular coupling in the mammalian brain." *Exp Physiol* 92(4): 641-6.
- Filosa, J. A., A. D. Bonev, S. V. Straub, A. L. Meredith, M. K. Wilkerson, R. W. Aldrich et M. T. Nelson (2006). "Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain." *Nat Neurosci* 9(11): 1397-1403.
- Fisher, M. et H. J. Meiselman (1991). "Hemorheological factors in cerebral ischemia." *Stroke* 22(9): 1164-9.
- Folstein, M. F., R. Maiberger et P. R. McHugh (1977). "Mood disorder as a specific complication of stroke." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 40(10): 1018-20.
- Franko, J., M. Pomfy, B. Novakova et L. Benes (1999). "Stobadine protects against ischemia-reperfusion induced morphological alterations of cerebral microcirculation in dogs." *Life Sci* 65(18-19): 1963-7.
- Freret, T., S. Valable, L. Chazalviel, R. Saulnier, E. T. Mackenzie, E. Petit, M. Bernaudin, M. Boulouard et P. Schumann-Bard (2006). "Delayed administration of deferoxamine reduces brain damage and promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in the rat." *Eur J Neurosci* 23(7): 1757-65.

- Frijns, C. J. et L. J. Kappelle (2002). "Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease." *Stroke* 33(8): 2115-22.
- Fruchart, J. C., P. Duriez et B. Staels (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis." *Curr Opin Lipidol* 10(3): 245-57.
- Fukui, S., T. Ookawara, H. Nawashiro, K. Suzuki et K. Shima (2002). "Post-ischemic transcriptional and translational responses of EC-SOD in mouse brain and serum." *Free Radic Biol Med* 32(3): 289-98.
- Furchgott, R. F. et J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* 288(5789): 373-6.
- Gaete, J. M. et J. Bogousslavsky (2008). "Post-stroke depression." *Expert Rev Neurother* 8(1): 75-92.
- Galea, E., E. V. Golanov, D. L. Feinstein, K. A. Kobylarz, S. B. Glickstein et D. J. Reis (1998). "Cerebellar stimulation reduces inducible nitric oxide synthase expression and protects brain from ischemia." *Am J Physiol* 274(6 Pt 2): H2035-45.
- Garneau, L., H. Klein, L. Parent et R. Sauve (2003). "Contribution of cytosolic cysteine residues to the gating properties of the Kir2.1 inward rectifier." *Biophys J* 84(6): 3717-29.
- Gasche, Y. et J. C. Copin (2003). "[Blood-brain barrier pathophysiology and ischaemic brain oedema]." *Ann Fr Anesth Reanim* 22(4): 312-9.
- Gerassimou, C., A. Kotanidou, Z. Zhou, D. C. Simoes, C. Roussos et A. Papapetropoulos (2007). "Regulation of the expression of soluble guanylyl cyclase by reactive oxygen species." *Br J Pharmacol* 150(8): 1084-91.
- Ginsberg, M. D. (2008). "Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future." *Neuropharmacology*.
- Girouard, H. et C. Iadecola (2006). "Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease." *J Appl Physiol* 100(1): 328-35.
- Giroud, M., B. Dahlof, K. Watchell et C. Thuillez (2004). "[Protection from stroke, updates and perspectives]." *Presse Med* 33(16): 1124-5.
- Golding, E. M., S. P. Marrelli, J. You et R. M. Bryan, Jr. (2002). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: a new regulator of cerebral blood flow?" *Stroke* 33(3): 661-3.
- Golding, E. M., C. S. Robertson et R. M. Bryan, Jr. (1998). "Comparison of the myogenic response in rat cerebral arteries of different calibers." *Brain Res* 785(2): 293-8.
- Gollasch, M. et M. T. Nelson (1997). "Voltage-dependent Ca²⁺ channels in arterial smooth muscle cells." *Kidney Blood Press Res* 20(6): 355-71.

Gonzalez-Perez, O., R. E. Gonzalez-Castaneda, M. Huerta, S. Luquin, U. Gomez-Pinedo, E. Sanchez-Almaraz, A. Navarro-Ruiz et J. Garcia-Estrada (2002). "Beneficial effects of alpha-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain." *Neurosci Lett* 321(1-2): 100-4.

Gordon, G. R., S. J. Mulligan et B. A. MacVicar (2007). "Astrocyte control of the cerebrovasculature." *Glia* 55(12): 1214-21.

Graham, S. H. et J. Chen (2001). "Programmed cell death in cerebral ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* 21(2): 99-109.

Gregoire, G., G. Loirand et P. Pacaud (1993). "Ca²⁺ and Sr²⁺ entry induced Ca²⁺ release from the intracellular Ca²⁺ store in smooth muscle cells of rat portal vein." *J Physiol* 472: 483-500.

Gu, W., T. Brannstrom, W. Jiang, A. Bergh et P. Wester (2001). "Vascular endothelial growth factor-A and -C protein up-regulation and early angiogenesis in a rat photothrombotic ring stroke model with spontaneous reperfusion." *Acta Neuropathol* 102(3): 216-26.

Gudi, T., J. C. Chen, D. E. Casteel, T. M. Seasholtz, G. R. Boss et R. B. Pilz (2002). "cGMP-dependent protein kinase inhibits serum-response element-dependent transcription by inhibiting rho activation and functions." *J Biol Chem* 277(40): 37382-93.

Guzik, T. J., N. E. West, R. Pillai, D. P. Taggart et K. M. Channon (2002). "Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels." *Hypertension* 39(6): 1088-94.

Hacke, W., G. Donnan, C. Fieschi, M. Kaste, R. von Kummer, J. P. Broderick, T. Brott, M. Frankel, J. C. Grotta, E. C. Haley, Jr., T. Kwiatkowski, S. R. Levine, C. Lewandowski, M. Lu, P. Lyden, J. R. Marler, S. Patel, B. C. Tilley, G. Albers, E. Bluhmki, M. Wilhelm et S. Hamilton (2004). "Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials." *Lancet* 363(9411): 768-74.

Hallenbeck, J. M. et A. J. Dutka (1990). "Background review and current concepts of reperfusion injury." *Arch Neurol* 47(11): 1245-54.

Hamel, E. (2006). "Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone." *J Appl Physiol* 100(3): 1059-64.

Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann et F. J. Sigworth (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch* 391(2): 85-100.

Hamm, R. J., B. R. Pike, D. M. O'Dell, B. G. Lyeth et L. W. Jenkins (1994). "The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury." *J Neurotrauma* 11(2): 187-96.

Hammond, C. et D. Tritesch (1990). *Neurobiologie cellulaire*. Paris.

- Hankey, G. J., K. Jamrozik, R. J. Broadhurst, S. Forbes, P. W. Burvill, C. S. Anderson et E. G. Stewart-Wynne (1998). "Long-term risk of first recurrent stroke in the Perth Community Stroke Study." *Stroke* 29(12): 2491-500.
- Hankey, G. J., K. Jamrozik, R. J. Broadhurst, S. Forbes, P. W. Burvill, C. S. Anderson et E. G. Stewart-Wynne (2000). "Five-year survival after first-ever stroke and related prognostic factors in the Perth Community Stroke Study." *Stroke* 31(9): 2080-6.
- Hashimoto, H., S. Ohta, H. Utsunomiya, Y. Kumon, S. Sakaki, S. Matsuda et M. Sakanaka (1999). "Changes in guanylate cyclase activity in arteriolar smooth muscle cells and hemodynamics after ischemia-reperfusion in rats." *Acta Neuropathol* 98(6): 603-13.
- Hickey, M. J., D. N. Granger et P. Kubes (2001). "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: studies in iNOS-deficient mice." *Acta Physiol Scand* 173(1): 119-26.
- Higashi, Y., D. Jitsuiki, K. Chayama et M. Yoshizumi (2006). "Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one), a novel free radical scavenger, for treatment of cardiovascular diseases." *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov* 1(1): 85-93.
- Hilgers, R. H. et R. C. Webb (2005). "Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho." *Exp Biol Med (Maywood)* 230(11): 829-35.
- Hong, Z., E. K. Weir, D. P. Nelson et A. Olschewski (2004). "Subacute hypoxia decreases voltage-activated potassium channel expression and function in pulmonary artery myocytes." *Am J Respir Cell Mol Biol* 31(3): 337-43.
- Hong, Z., E. K. Weir, A. Varghese et A. Olschewski (2005). "Effect of normoxia and hypoxia on K(+) current and resting membrane potential of fetal rabbit pulmonary artery smooth muscle." *Physiol Res* 54(2): 175-84.
- Horakova, L. et S. Stolc (1998). "Antioxidant and pharmacodynamic effects of pyridoindele stobadine." *Gen Pharmacol* 30(5): 627-38.
- Horowitz, D. R., S. Tuhim, J. M. Weinberger et S. H. Rudolph (1992). "Mechanisms in lacunar infarction." *Stroke* 23(3): 325-7.
- Hossmann, K. A. (1994). "Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia." *Ann Neurol* 36(4): 557-65.
- Iadecola, C. (1997). "Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury." *Trends Neurosci* 20(3): 132-9.
- Iadecola, C. (2004). "Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* 5(5): 347-60.
- Iadecola, C., C. A. Salkowski, F. Zhang, T. Aber, M. Nagayama, S. N. Vogel et M. E. Ross (1999). "The transcription factor interferon regulatory factor 1 is expressed after cerebral ischemia and contributes to ischemic brain injury." *J Exp Med* 189(4): 719-27.

Iliff, J. J., R. D'Ambrosio, A. C. Ngai et H. R. Winn (2003). "Adenosine receptors mediate glutamate-evoked arteriolar dilation in the rat cerebral cortex." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(5): H1631-7.

Inoue, H., X. F. Jiang, T. Katayama, S. Osada, K. Umesono et S. Namura (2003). "Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice." *Neurosci Lett* 352(3): 203-6.

Ishiguro, M., A. D. Morielli, K. Zvarova, B. I. Tranmer, P. L. Penar et G. C. Wellman (2006). "Oxyhemoglobin-induced suppression of voltage-dependent K⁺ channels in cerebral arteries by enhanced tyrosine kinase activity." *Circ Res* 99(11): 1252-60.

Iwatsuki, K., E. Kumura, T. Yoshimine, K. Yamamoto, M. Sato et T. Hayakawa (1998). "Increase in jugular levels of polymorphonuclear neutrophil elastase in patients with acute cerebral infarction." *Neurol Res* 20(5): 397-402.

Jackson, W. F. (1998). "Potassium channels and regulation of the microcirculation." *Microcirculation* 5(2-3): 85-90.

Jackson, W. F. (2000). "Ion channels and vascular tone." *Hypertension* 35(1 Pt 2): 173-8.

Jimenez-Altayo, F., A. Martin, S. Rojas, C. Justicia, A. M. Briones, J. Giraldo, A. M. Planas et E. Vila (2007). "Transient middle cerebral artery occlusion causes different structural, mechanical, and myogenic alterations in normotensive and hypertensive rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(1): H628-35.

Johnson, T. D. (1998). "Polyamines and cerebral ischemia." *Prog Drug Res* 50: 193-258.

Johnson, T. D., S. P. Marrelli, M. L. Steenberg, W. F. Childres et R. M. Bryan, Jr. (1998). "Inward rectifier potassium channels in the rat middle cerebral artery." *Am J Physiol* 274(2 Pt 2): R541-7.

Jolkkonen, J., N. P. Gallagher, K. Zilles et J. Sivenius (2003). "Behavioral deficits and recovery following transient focal cerebral ischemia in rats: glutamatergic and GABAergic receptor densities." *Behav Brain Res* 138(2): 187-200.

Kainu, T., A. C. Wikstrom, J. A. Gustafsson et M. Peltö-Huikko (1994). "Localization of the peroxisome proliferator-activated receptor in the brain." *Neuroreport* 5(18): 2481-5.

Kass, D. A., H. C. Champion et J. A. Beavo (2007). "Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation." *Circ Res* 101(11): 1084-95.

Kermani, P. et B. Hempstead (2007). "Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis." *Trends Cardiovasc Med* 17(4): 140-3.

Kis, B., J. A. Snipes, S. A. Simandle et D. W. Busija (2005). "Acetaminophen-sensitive prostaglandin production in rat cerebral endothelial cells." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(4): R897-902.

- Knot, H. J. et M. T. Nelson (1995). "Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K⁺ channels in rabbit myogenic cerebral arteries." *Am J Physiol* 269(1 Pt 2): H348-55.
- Ko, E. A., J. Han, I. D. Jung et W. S. Park (2008). "Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells." *J Smooth Muscle Res* 44(2): 65-81.
- Koedel, U., S. Lorenzl, C. Gorriz, R. M. Arendt et H. W. Pfister (1998). "Endothelin B receptor-mediated increase of cerebral blood flow in experimental pneumococcal meningitis." *J Cereb Blood Flow Metab* 18(1): 67-74.
- Koehler, R. C., D. Gebremedhin et D. R. Harder (2006). "Role of astrocytes in cerebrovascular regulation." *J Appl Physiol* 100(1): 307-17.
- Koller, H., M. Schroeter, S. Jander, G. Stoll et M. Siebler (2000). "Time course of inwardly rectifying K(+) current reduction in glial cells surrounding ischemic brain lesions." *Brain Res* 872(1-2): 194-8.
- Kong, R. S., J. Butterworth, W. Aveling, D. A. Stump, M. J. Harrison, J. Hammon, J. Stygall, K. D. Rorie et S. P. Newman (2002). "Clinical trial of the neuroprotectant clomethiazole in coronary artery bypass graft surgery: a randomized controlled trial." *Anesthesiology* 97(3): 585-91.
- Kontos, H. A. (2001). "Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture." *Stroke* 32(11): 2712-6.
- Kourie, J. I. (1998). "Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms." *Am J Physiol* 275(1 Pt 1): C1-24.
- Kreisel, S. H., H. Bazner et M. G. Hennerici (2006). "Pathophysiology of stroke rehabilitation: temporal aspects of neuro-functional recovery." *Cerebrovasc Dis* 21(1-2): 6-17.
- Kristian, T. et B. K. Siesjo (1998). "Calcium in ischemic cell death." *Stroke* 29(3): 705-18.
- Krupinski, J., P. Stroemer, M. Slevin, E. Marti, P. Kumar et F. Rubio (2003). "Three-dimensional structure and survival of newly formed blood vessels after focal cerebral ischemia." *Neuroreport* 14(8): 1171-6.
- Kuriyama, H., K. Kitamura et H. Nabata (1995). "Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues." *Pharmacol Rev* 47(3): 387-573.
- Kuroda, S., R. Tsuchidate, M. L. Smith, K. R. Maples et B. K. Siesjo (1999). "Neuroprotective effects of a novel nitron, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat." *J Cereb Blood Flow Metab* 19(7): 778-87.
- Lammie, G. A. (2002). "Hypertensive cerebral small vessel disease and stroke." *Brain Pathol* 12(3): 358-70.

- Lee, J. M., M. C. Grabb, G. J. Zipfel et D. W. Choi (2000). "Brain tissue responses to ischemia." *J Clin Invest* 106(6): 723-31.
- Lees, K. R., J. A. Zivin, T. Ashwood, A. Davalos, S. M. Davis, H. C. Diener, J. Grotta, P. Lyden, A. Shuaib, H. G. Hardemark et W. W. Wasiewski (2006). "NXY-059 for acute ischemic stroke." *N Engl J Med* 354(6): 588-600.
- Leker, R. R., A. Teichner, H. Ovadia, E. Keshet, E. Reinherz et T. Ben-Hur (2001). "Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ischemic penumbra: relationship to expression of neuronal nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor." *Brain Res* 909(1-2): 1-7.
- Li, J., K. M. Doyle et T. Tatlisumak (2007). "Polyamines in the brain: distribution, biological interactions, and their potential therapeutic role in brain ischaemia." *Curr Med Chem* 14(17): 1807-13.
- Li, L., Q. Jiang, L. Zhang, G. Ding, Z. Gang Zhang, Q. Li, J. R. Ewing, M. Lu, S. Panda, K. A. Ledbetter, P. A. Whitton et M. Chopp (2007). "Angiogenesis and improved cerebral blood flow in the ischemic boundary area detected by MRI after administration of sildenafil to rats with embolic stroke." *Brain Res* 1132(1): 185-92.
- Li, Y., Z. Lu, C. L. Keogh, S. P. Yu et L. Wei (2007). "Erythropoietin-induced neurovascular protection, angiogenesis, and cerebral blood flow restoration after focal ischemia in mice." *J Cereb Blood Flow Metab* 27(5): 1043-54.
- Lin, T. N., Y. Y. He, G. Wu, M. Khan et C. Y. Hsu (1993). "Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats." *Stroke* 24(1): 117-21.
- Liu, Y. et D. D. Gutterman (2002). "Oxidative stress and potassium channel function." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29(4): 305-11.
- Lledo, P. M., M. Alonso et M. S. Grubb (2006). "Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits." *Nat Rev Neurosci* 7(3): 179-93.
- Lodder, J., L. van Raak, A. Hilton, E. Hardy et A. Kessels (2006). "Diazepam to improve acute stroke outcome: results of the early GABA-Ergic activation study in stroke trial. a randomized double-blind placebo-controlled trial." *Cerebrovasc Dis* 21(1-2): 120-7.
- Lok, J., P. Gupta, S. Guo, W. J. Kim, M. J. Whalen, K. van Leyen et E. H. Lo (2007). "Cell-cell signaling in the neurovascular unit." *Neurochem Res* 32(12): 2032-45.
- Longa, E. Z., P. R. Weinstein, S. Carlson et R. Cummins (1989). "Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats." *Stroke* 20(1): 84-91.
- Lu, K. T., R. Y. Chiou, L. G. Chen, M. H. Chen, W. T. Tseng, H. T. Hsieh et Y. L. Yang (2006). "Neuroprotective effects of resveratrol on cerebral ischemia-induced neuron loss mediated by free radical scavenging and cerebral blood flow elevation." *J Agric Food Chem* 54(8): 3126-31.

- Lubomirov, L. T., K. Reimann, D. Metzler, V. Hasse, R. Stehle, M. Ito, D. J. Hartshorne, H. Gagov, G. Pfitzer et R. Schubert (2006). "Urocortin-induced decrease in Ca²⁺ sensitivity of contraction in mouse tail arteries is attributable to cAMP-dependent dephosphorylation of MYPT1 and activation of myosin light chain phosphatase." *Circ Res* 98(9): 1159-67.
- Luykenaar, K. D., S. E. Brett, B. N. Wu, W. B. Wiehler et D. G. Welsh (2004). "Pyrimidine nucleotides suppress KDR currents and depolarize rat cerebral arteries by activating Rho kinase." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(3): H1088-100.
- Luykenaar, K. D. et D. G. Welsh (2007). "Activators of the PKA and PKG pathways attenuate RhoA-mediated suppression of the KDR current in cerebral arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(6): H2654-63.
- MacMahon, S., R. Peto, J. Cutler, R. Collins, P. Sorlie, J. Neaton, R. Abbott, J. Godwin, A. Dyer et J. Stamler (1990). "Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias." *Lancet* 335(8692): 765-74.
- Maingret, F., E. Honore, M. Lazdunski et A. J. Patel (2002). "Molecular basis of the voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K(+) channel." *Biochem Biophys Res Commun* 292(2): 339-46.
- Majno, G. et I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." *Am J Pathol* 146(1): 3-15.
- Maneen, M. J. et M. J. Cipolla (2007). "Peroxyntirite diminishes myogenic tone in cerebral arteries: role of nitrotyrosine and F-actin." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(2): H1042-50.
- Maneen, M. J., R. Hannah, L. Vitullo, N. DeLance et M. J. Cipolla (2006). "Peroxyntirite diminishes myogenic activity and is associated with decreased vascular smooth muscle F-actin in rat posterior cerebral arteries." *Stroke* 37(3): 894-9.
- Manganello, J. M., J. S. Huang, T. Kozasa, T. A. Voyno-Yasenetskaya et G. C. Le Breton (2003). "Protein kinase A-mediated phosphorylation of the Galpha13 switch I region alters the Galphabeta13-G protein-coupled receptor complex and inhibits Rho activation." *J Biol Chem* 278(1): 124-30.
- Marrelli, S. P. (2000). "Selective measurement of endothelial or smooth muscle [Ca²⁺]_i in pressurized/perfused cerebral arteries with fura-2." *J Neurosci Methods* 97(2): 145-55.
- Marrelli, S. P. (2002). "Altered endothelial Ca²⁺ regulation after ischemia/reperfusion produces potentiated endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations." *Stroke* 33(9): 2285-91.
- Marrelli, S. P., M. S. Eckmann et M. S. Hunte (2003). "Role of endothelial intermediate conductance K_{Ca} channels in cerebral EDHF-mediated dilations." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(4): H1590-9.

- Marrelli, S. P., T. D. Johnson, A. Khorovets, W. F. Childres et R. M. Bryan, Jr. (1998). "Altered function of inward rectifier potassium channels in cerebrovascular smooth muscle after ischemia/reperfusion." *Stroke* 29(7): 1469-74.
- Matsumoto, T., T. Kobayashi et K. Kamata (2003). "Phosphodiesterases in the vascular system." *J Smooth Muscle Res* 39(4): 67-86.
- Matsuo, Y., S. Mihara, M. Ninomiya et M. Fujimoto (2001). "Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats." *Stroke* 32(9): 2143-8.
- McDonald, T. F., S. Pelzer, W. Trautwein et D. J. Pelzer (1994). "Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells." *Physiol Rev* 74(2): 365-507.
- McNeish, A. J., K. A. Dora et C. J. Garland (2005). "Possible role for K⁺ in endothelium-derived hyperpolarizing factor-linked dilatation in rat middle cerebral artery." *Stroke* 36(7): 1526-32.
- Mehta, S. L., N. Manhas et R. Raghbir (2007). "Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics." *Brain Res Rev* 54(1): 34-66.
- Menzies, S. A., A. L. Betz et J. T. Hoff (1993). "Contributions of ions and albumin to the formation and resolution of ischemic brain edema." *J Neurosurg* 78(2): 257-66.
- Mies, G., T. Iijima et K. A. Hossmann (1993). "Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat." *Neuroreport* 4(6): 709-11.
- Moreno, S., S. Farioli-Vecchioli et M. P. Ceru (2004). "Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS." *Neuroscience* 123(1): 131-45.
- Morgan, K. G. et S. S. Gangopadhyay (2001). "Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins." *J Appl Physiol* 91(2): 953-62.
- Muranyi, A., D. Derkach, F. Erdodi, A. Kiss, M. Ito et D. J. Hartshorne (2005). "Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells." *FEBS Lett* 579(29): 6611-5.
- Murry, C. E., R. B. Jennings et K. A. Reimer (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." *Circulation* 74(5): 1124-36.
- Nedergaard, M., B. Ransom et S. A. Goldman (2003). "New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain." *Trends Neurosci* 26(10): 523-30.
- Nelson, C. W., E. P. Wei, J. T. Povlishock, H. A. Kontos et M. A. Moskowitz (1992). "Oxygen radicals in cerebral ischemia." *Am J Physiol* 263(5 Pt 2): H1356-62.
- Nelson, M. T. et J. M. Quayle (1995). "Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle." *Am J Physiol* 268(4 Pt 1): C799-822.

Neumar, R. W. (2000). "Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury." *Ann Emerg Med* 36(5): 483-506.

Nilius, B. et G. Droogmans (2001). "Ion channels and their functional role in vascular endothelium." *Physiol Rev* 81(4): 1415-59.

Nogawa, S., F. Zhang, M. E. Ross et C. Iadecola (1997). "Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage." *J Neurosci* 17(8): 2746-55.

Ouk, T., O. Pétrault, S. Gautier, P. Gele, M. Laprais, P. Duriez, M. Bastide et R. Bordet (2005). "Acute treatment by a PPAR-alpha agonist decreases cerebral infarct volume and prevents post-ischemic endothelium and Kir2.1 impairment." *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 56.

Pannu, R. et I. Singh (2006). "Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms." *Neurochem Int* 49(2): 170-82.

Pardridge, W. M. (2002). "Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses." *Nat Rev Drug Discov* 1(2): 131-9.

Park, W. S., J. Han et Y. E. Earm (2008). "Physiological role of inward rectifier K(+) channels in vascular smooth muscle cells." *Pflugers Arch*.

Park, W. S., J. Han, N. Kim, J. B. Youm, H. Joo, H. K. Kim, J. H. Ko et Y. E. Earm (2005). "Endothelin-1 inhibits inward rectifier K+ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells through protein kinase C." *J Cardiovasc Pharmacol* 46(5): 681-9.

Parkington, H. C., H. A. Coleman et M. Tare (2004). "Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization." *Pharmacol Res* 49(6): 509-14.

Pereira, M. P., O. Hurtado, A. Cardenas, D. Alonso-Escolano, L. Bosca, J. Vivancos, F. Nombela, J. C. Leza, P. Lorenzo, I. Lizasoain et M. A. Moro (2005). "The nonthiazolidinedione PPARgamma agonist L-796,449 is neuroprotective in experimental stroke." *J Neuropathol Exp Neurol* 64(9): 797-805.

Pessin, M. S., R. C. Hinton, K. R. Davis, G. W. Duncan, G. H. Roberson, R. H. Ackerman et J. P. Mohr (1979). "Mechanisms of acute carotid stroke." *Ann Neurol* 6(3): 245-52.

Pétrault, O., M. Bastide, N. Cotelle, P. Gele, S. Gautier, M. Laprais, J. Vamecq, P. Duriez et R. Bordet (2004). "The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivate di-tert-butylhydroxyphenyl is parallel to the preventive effect on post-ischemic Kir2.x impairment but not to post-ischemic endothelial dysfunction." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370(5): 395-403.

Pétrault, O., T. Ouk, S. Gautier, M. Laprais, P. Gele, M. Bastide et R. Bordet (2005). "Pharmacological neutropenia prevents endothelial dysfunction but not smooth muscle functions impairment induced by middle cerebral artery occlusion." *Br J Pharmacol* 144(8): 1051-8.

Plane, F., R. Johnson, P. Kerr, W. Wiehler, K. Thorneloe, K. Ishii, T. Chen et W. Cole (2005). "Heteromultimeric Kv1 channels contribute to myogenic control of arterial diameter." *Circ Res* 96(2): 216-24.

Poulos, T. L. (2006). "Soluble guanylate cyclase." *Curr Opin Struct Biol* 16(6): 736-43.

Presta, A., J. Liu, W. C. Sessa et D. J. Stuehr (1997). "Substrate binding and calmodulin binding to endothelial nitric oxide synthase coregulate its enzymatic activity." *Nitric Oxide* 1(1): 74-87.

Pritchard, T. C. et K. D. Alloway (2002). *Neurosciences cellulaires, in Neurosciences médicales: les bases neuroanatomiques et neurophysiologiques, First Edition*, pp 13-72. Paris.

Pu, Q., R. Bordet, E. Robin, F. Puisieux, B. Vallet et B. Dupuis (1999). "Low dose of lipopolysaccharide induces a delayed enhanced nitric oxide-mediated relaxation in rat aorta." *Eur J Pharmacol* 377(2-3): 209-14.

Puisieux, F., D. Deplanque, Q. Pu, E. Souil, M. Bastide et R. Bordet (2000). "Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance." *Eur J Pharmacol* 389(1): 71-8.

Quayle, J. M., C. Dart et N. B. Standen (1996). "The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle." *J Physiol* 494 (Pt 3): 715-26.

Quayle, J. M., J. G. McCarron, J. E. Brayden et M. T. Nelson (1993). "Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries." *Am J Physiol* 265(5 Pt 1): C1363-70.

Rancillac, A., J. Rossier, M. Guille, X. K. Tong, H. Geoffroy, C. Amatore, S. Arbault, E. Hamel et B. Cauli (2006). "Glutamatergic Control of Microvascular Tone by Distinct GABA Neurons in the Cerebellum." *J Neurosci* 26(26): 6997-7006.

Richard, D. et D. Orsal (2001). *Neurophysiologie, Organisation et fonctionnement du système nerveux, 2ème édition*.

Ricote, M. et C. K. Glass (2007). "PPARs and molecular mechanisms of transrepression." *Biochim Biophys Acta* 1771(8): 926-35.

Ringelstein, E. B., S. Koschorke, A. Holling, A. Thron, H. Lambertz et C. Minale (1989). "Computed tomographic patterns of proven embolic brain infarctions." *Ann Neurol* 26(6): 759-65.

Rivers, R. J., T. W. Hein, C. Zhang et L. Kuo (2001). "Activation of barium-sensitive inward rectifier potassium channels mediates remote dilation of coronary arterioles." *Circulation* 104(15): 1749-53.

Rosenblum, W. I. (2003). "ATP-sensitive potassium channels in the cerebral circulation." *Stroke* 34(6): 1547-52.

- Ross, J. et W. M. Armstead (2003). "Differential role of PTK and ERK MAPK in superoxide impairment of K(ATP) and K(Ca) channel cerebrovasodilation." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(1): R149-54.
- Rossi, D. J., J. D. Brady et C. Mohr (2007). "Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia." *Nat Neurosci* 10(11): 1377-86.
- Rossini, P. M., C. Calautti, F. Pauri et J. C. Baron (2003). "Post-stroke plastic reorganisation in the adult brain." *Lancet Neurol* 2(8): 493-502.
- Rozanski, G. J. et Z. Xu (2002). "Sulfhydryl modulation of K⁺ channels in rat ventricular myocytes." *J Mol Cell Cardiol* 34(12): 1623-32.
- Rubbo, H., R. Radi, M. Trujillo, R. Telleri, B. Kalyanaraman, S. Barnes, M. Kirk et B. A. Freeman (1994). "Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives." *J Biol Chem* 269(42): 26066-75.
- Ruscher, K., N. Isaev, G. Trendelenburg, M. Weih, L. Iurato, A. Meisel et U. Dirnagl (1998). "Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons." *Neurosci Lett* 254(2): 117-20.
- Rush, J. W., S. G. Denniss et D. A. Graham (2005). "Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity." *Can J Appl Physiol* 30(4): 442-74.
- Russo, I., P. Del Mese, G. Doronzo, L. Mattiello, M. Viretto, A. Bosia, G. Anfossi et M. Trovati (2008). "Resistance to the nitric oxide/cyclic guanosine 5'-monophosphate/protein kinase G pathway in vascular smooth muscle cells from the obese Zucker rat, a classical animal model of insulin resistance: role of oxidative stress." *Endocrinology* 149(4): 1480-9.
- Satake, K., Y. Matsuyama, M. Kamiya, H. Kawakami, H. Iwata, K. Adachi et K. Kiuchi (2000). "Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury." *Brain Res Mol Brain Res* 85(1-2): 114-22.
- Schallert, T., T. D. Hernandez et T. M. Barth (1986). "Recovery of function after brain damage: severe and chronic disruption by diazepam." *Brain Res* 379(1): 104-11.
- Schonewille, W. J., S. Tuhim, M. B. Singer et S. W. Atlas (1999). "Diffusion-weighted MRI in acute lacunar syndromes. A clinical-radiological correlation study." *Stroke* 30(10): 2066-9.
- Schubert, R., U. Krien, I. Wulfsen, D. Schiemann, G. Lehmann, N. Ulfig, R. W. Veh, J. R. Schwarz et H. Gago (2004). "Nitric oxide donor sodium nitroprusside dilates rat small arteries by activation of inward rectifier potassium channels." *Hypertension* 43(4): 891-6.
- Schulze, C. et J. A. Firth (1993). "Immunohistochemical localization of adherens junction components in blood-brain barrier microvessels of the rat." *J Cell Sci* 104 (Pt 3): 773-82.
- Segura, I., A. Serrano, G. G. De Buitrago, M. A. Gonzalez, J. L. Abad, C. Claveria, L. Gomez, A. Bernad, A. C. Martinez et H. H. Riese (2002). "Inhibition of programmed cell

death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis." *Faseb J* 16(8): 833-41.

Shin, H. Y., J. H. Kim, J. H. Phi, C. K. Park, J. E. Kim, J. H. Kim, S. H. Paek, K. C. Wang et D. G. Kim (2008). "Endogenous neurogenesis and neovascularization in the neocortex of the rat after focal cerebral ischemia." *J Neurosci Res* 86(2): 356-67.

Shinton, R. et G. Beevers (1989). "Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke." *Bmj* 298(6676): 789-94.

Shipston, M. J. et D. L. Armstrong (1996). "Activation of protein kinase C inhibits calcium-activated potassium channels in rat pituitary tumour cells." *J Physiol* 493 (Pt 3): 665-72.

Shuaib, A., K. R. Lees, P. Lyden, J. Grotta, A. Davalos, S. M. Davis, H. C. Diener, T. Ashwood, W. W. Wasiewski et U. Emeribe (2007). "NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke." *N Engl J Med* 357(6): 562-71.

Silvestrini, M., L. M. Cupini, F. Placidi, M. Diomedei et G. Bernardi (1998). "Bilateral hemispheric activation in the early recovery of motor function after stroke." *Stroke* 29(7): 1305-10.

Simard, M., G. Arcuino, T. Takano, Q. S. Liu et M. Nedergaard (2003). "Signaling at the gliovascular interface." *J Neurosci* 23(27): 9254-62.

Sims, N. R. et M. F. Anderson (2002). "Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke." *Neurochem Int* 40(6): 511-26.

Sinha, K., G. Chaudhary et Y. K. Gupta (2002). "Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats." *Life Sci* 71(6): 655-65.

Smith, P. D., S. E. Brett, K. D. Luykenaar, S. L. Sandow, S. P. Marrelli, E. J. Vigmond et D. G. Welsh (2008). "KIR channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle." *J Physiol* 586(4): 1147-60.

Sobey, C. G. et F. M. Faraci (1999). "Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide." *Br J Pharmacol* 126(6): 1437-43.

Sobey, C. G. et L. Quan (1999). "Impaired cerebral vasodilator responses to NO and PDE V inhibition after subarachnoid hemorrhage." *Am J Physiol* 277(5 Pt 2): H1718-24.

Sokoya, E. M., A. R. Burns, C. T. Setiawan, H. A. Coleman, H. C. Parkington et M. Tare (2006). "Evidence for the involvement of myoendothelial gap junctions in EDHF-mediated relaxation in the rat middle cerebral artery." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(1): H385-93.

Soltes, L., S. Bezek, E. Ujhazy et V. Bauer (2000). "Extraction and chromatographic separation methods in pharmacokinetic studies of Stobadine--an indole-related antioxidant and free-radical scavenger." *Biomed Chromatogr* 14(3): 188-201.

- Somlyo, A. P. et A. V. Somlyo (2003). "Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase." *Physiol Rev* 83(4): 1325-58.
- Sotnikova, R., L. Okruhlicova et P. Noskovic (1998). "Endothelial protective effect of stobadine on ischaemia/reperfusion-induced injury." *Gen Physiol Biophys* 17(3): 253-64.
- Stolc, S., R. Vlkolinsky et J. Pavlasek (1997). "Neuroprotection by the pyridoindole stobadine: a minireview." *Brain Res Bull* 42(5): 335-40.
- Stoll, G., S. Jander et M. Schroeter (1998). "Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions." *Prog Neurobiol* 56(2): 149-71.
- Stone, T. W. et J. I. Addae (2002). "The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection." *Eur J Pharmacol* 447(2-3): 285-96.
- Sun, C. W., J. R. Falck, H. Okamoto, D. R. Harder et R. J. Roman (2000). "Role of cGMP versus 20-HETE in the vasodilator response to nitric oxide in rat cerebral arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279(1): H339-50.
- Sun, Y., K. Jin, L. Xie, J. Childs, X. O. Mao, A. Logvinova et D. A. Greenberg (2003). "VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia." *J Clin Invest* 111(12): 1843-51.
- Sydserff, S. G., A. R. Borelli, A. R. Green et A. J. Cross (2002). "Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat; studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window." *Br J Pharmacol* 135(1): 103-12.
- Tanaka, T., Y. Fukunaga, H. Itoh, K. Doi, J. Yamashita, T. H. Chun, M. Inoue, K. Masatsugu, T. Saito, N. Sawada, S. Sakaguchi, H. Arai et K. Nakao (2005). "Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma for monocyte recruitment and endothelial regeneration." *Eur J Pharmacol* 508(1-3): 255-65.
- Tang, X. D., M. L. Garcia, S. H. Heinemann et T. Hoshi (2004). "Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing." *Nat Struct Mol Biol* 11(2): 171-8.
- Tatu, L., T. Moulin, J. Bogousslavsky et H. Duvernoy (1998). "Arterial territories of the human brain: cerebral hemispheres." *Neurology* 50(6): 1699-708.
- Terashvili, M., P. F. Pratt, D. Gebremedhin, J. Narayanan et D. R. Harder (2006). "Reactive oxygen species cerebral autoregulation in health and disease." *Pediatr Clin North Am* 53(5): 1029-37, xi.
- Thorneloe, K. S., T. T. Chen, P. M. Kerr, E. F. Grier, B. Horowitz, W. C. Cole et M. P. Walsh (2001). "Molecular composition of 4-aminopyridine-sensitive voltage-gated K(+) channels of vascular smooth muscle." *Circ Res* 89(11): 1030-7.
- Torvik, A. et K. Skullerud (1976). "How often are brain infarcts caused by hypotensive episodes?" *Stroke* 7(3): 255-7.

- Toung, T. J., Y. Chang, J. Lin et A. Bhardwaj (2005). "Increases in lung and brain water following experimental stroke: effect of mannitol and hypertonic saline." *Crit Care Med* 33(1): 203-8; discussion 259-60.
- Tsutsumi, K. (1986). "[Experimental cerebral infarction in the dog. Scanning electron microscopy with vascular endocasts of microvessels in the ischemic brain]." *Neurol Med Chir (Tokyo)* 26(8): 595-600.
- Urena, J., A. del Valle-Rodriguez et J. Lopez-Barneo (2007). "Metabotropic Ca²⁺ channel-induced calcium release in vascular smooth muscle." *Cell Calcium* 42(4-5): 513-20.
- van der Worp, H. B., P. de Haan, E. Morrema et C. J. Kalkman (2005). "Methodological quality of animal studies on neuroprotection in focal cerebral ischaemia." *J Neurol* 252(9): 1108-14.
- Vannucchi, M. G., E. Bizzoco, L. Corsani, M. Gianfriddo, F. Pedata et M. S. Fausone-Pellegrini (2007). "Relationships between neurons expressing neuronal nitric oxide synthase, degree of microglia activation and animal survival. A study in the rat cortex after transient ischemia." *Brain Res* 1132(1): 218-27.
- Vetri, F., D. Menicucci, D. Lapi, A. Gemignani et A. Colantuoni (2007). "Pial arteriolar vasomotion changes during cortical activation in rats." *Neuroimage* 38(1): 25-33.
- Wang, C. X. et A. Shuaib (2007). "Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury." *Prog Neurobiol* 83(3): 140-8.
- Wang, L., Z. Zhang, Y. Wang, R. Zhang et M. Chopp (2004). "Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats." *Stroke* 35(7): 1732-7.
- Warlow, C. et J. Wardlaw (2003). "Therapeutic thrombolysis for acute ischaemic stroke." *Bmj* 326(7383): 233-4.
- Warner, D. S., H. Sheng et I. Batinic-Haberle (2004). "Oxidants, antioxidants and the ischemic brain." *J Exp Biol* 207(Pt 18): 3221-31.
- Wei, L., J. P. Erinjeri, C. M. Rovainen et T. A. Woolsey (2001). "Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke." *Stroke* 32(9): 2179-84.
- Weimar, C., A. Ziegler, I. R. Konig et H. C. Diener (2002). "Predicting functional outcome and survival after acute ischemic stroke." *J Neurol* 249(7): 888-95.
- Wiltout, C., B. Lang, Y. Yan, R. J. Dempsey et R. Vemuganti (2007). "Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis." *Neurochem Int* 50(7-8): 1028-41.
- Witte, O. W., H. J. Bidmon, K. Schiene, C. Redecker et G. Hagemann (2000). "Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* 20(8): 1149-65.

- Wu, A., Z. Ying et F. Gomez-Pinilla (2006). "Dietary curcumin counteracts the outcome of traumatic brain injury on oxidative stress, synaptic plasticity, and cognition." *Exp Neurol* 197(2): 309-17.
- Wu, D. M., H. Kawamura, K. Sakagami, M. Kobayashi et D. G. Puro (2003). "Cholinergic regulation of pericyte-containing retinal microvessels." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(6): H2083-90.
- Yepes, M., M. Sandkvist, M. K. Wong, T. A. Coleman, E. Smith, S. L. Cohan et D. A. Lawrence (2000). "Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis." *Blood* 96(2): 569-76.
- You, R., J. J. McNeil, H. M. O'Malley, S. M. Davis et G. A. Donnan (1995). "Risk factors for lacunar infarction syndromes." *Neurology* 45(8): 1483-7.
- Yu, M., C. W. Sun, K. G. Maier, D. R. Harder et R. J. Roman (2002). "Mechanism of cGMP contribution to the vasodilator response to NO in rat middle cerebral arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(5): H1724-31.
- Zausinger, S., E. Hungerhuber, A. Baethmann, H. Reulen et R. Schmid-Elsaesser (2000). "Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms." *Brain Res* 863(1-2): 94-105.
- Zhang, F., S. Xu et C. Iadecola (1995). "Role of nitric oxide and acetylcholine in neocortical hyperemia elicited by basal forebrain stimulation: evidence for an involvement of endothelial nitric oxide." *Neuroscience* 69(4): 1195-204.
- Zhang, L., J. Chen, Y. Li, Z. G. Zhang et M. Chopp (2000). "Quantitative measurement of motor and somatosensory impairments after mild (30 min) and severe (2 h) transient middle cerebral artery occlusion in rats." *J Neurol Sci* 174(2): 141-6.
- Zhang, L., T. Schallert, Z. G. Zhang, Q. Jiang, P. Arniago, Q. Li, M. Lu et M. Chopp (2002). "A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia." *J Neurosci Methods* 117(2): 207-14.
- Zhang, Z., M. Chopp, A. Goussev et C. Powers (1998). "Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia." *Brain Res* 784(1-2): 210-7.
- Zhao, G., A. Adebisi, Q. Xi et J. H. Jaggar (2007). "Hypoxia reduces KCa channel activity by inducing Ca²⁺ spark uncoupling in cerebral artery smooth muscle cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 292(6): C2122-8.
- Zhao, Y., A. Patzer, T. Herdegen, P. Gohlke et J. Culman (2006). "Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats." *Faseb J* 20(8): 1162-75.
- Zhao, Z., M. Cheng, K. R. Maples, J. Y. Ma et A. M. Buchan (2001). "NXY-059, a novel free radical trapping compound, reduces cortical infarction after permanent focal cerebral ischemia in the rat." *Brain Res* 909(1-2): 46-50.

