



HAL
open science

La protéine disulfide isomérase et l'ischémie reperfusion cérébrale: une voie de neuroprotection?

Elodie Descamps

► **To cite this version:**

Elodie Descamps. La protéine disulfide isomérase et l'ischémie reperfusion cérébrale: une voie de neuroprotection?. Neurosciences [q-bio.NC]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT: . tel-00399737

HAL Id: tel-00399737

<https://theses.hal.science/tel-00399737>

Submitted on 29 Jun 2009

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

Année 2009

N° _____

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR de L'UNIVERSITE de LILLE II

Discipline : Neurosciences

Présentée par

Elodie Descamps

**La protéine disulfide isomérase et l'ischémie cérébrale :
une voie de neuroprotection ?**

Directeur de Thèse : Joseph Vamecq

Soutenue le 15 juin 2009

JURY

Pierre Gressens

Président

Mustapha Cherkaoui-Malki

Rapporteur

Jacques Poupaert

Rapporteur

Michèle Bastide

Examineur

Joseph Vamecq

Directeur de thèse

Ce travail expérimental a été effectué dans le laboratoire de pharmacologie dirigé par Monsieur le Professeur Régis Bordet, au sein de l'Equipe d'Accueil EA 1046 sous la responsabilité du Docteur Joseph Vamecq. Je les remercie de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Mustapha Cherkaoui-Malki et Monsieur le Professeur Jacques Poupaert d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail. Soyez assuré de mon estime et de mon plus grand respect d'avoir accompli cette lourde tâche.

Monsieur le Professeur Pierre Gressens, 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 Madame Michèle Bastide d'avoir accepté de siéger dans le jury pour examiner ce travail.

Au Docteur Vamecq, merci de m'avoir accompagnée et encadrée lors de ma thèse. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer un travail de recherche dans un domaine passionnant.

Au Professeur Régis Bordet, je voulais vous remercier pour vos conseils qui m'ont été précieux. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Jean-Christophe, merci pour nos longues conversations, scientifiques ou non, qui m'ont permis d'y voir plus clair.

Maud et Cécile, merci pour votre aide technique, mais surtout pour tous les bons moments et les fous rires partagés. J'espère que le futur nous en réservera beaucoup d'autres.

Merci à Cédric, Thavarak, Florent, Olivier, Fabrice, Kevin, Sophie, Charlotte, Camille, Sébastien et Julie de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans une ambiance chaleureuse et agréable, pimentée d'un humour incomparable. Merci pour votre aide et vos conseils.

Merci également à Nadine, Sabine, Jackie et Bérangère pour votre spontanéité, votre aide et pour tous les bons moments passés avec vous.

Je tiens à remercier la SNCB qui m'a véhiculée durant ces années. Merci à tous ces retards qui m'ont permis de rencontrer Bérangère, montpelliéraine de Belgique.

Merci à tous mes amis montois, lillois et autres d'avoir été là quand le moral n'y était pas.

Merci à mes parents d'avoir cru en moi jusqu'ici. J'espère ne pas vous avoir déçu, et que vous pourrez être fiers de moi. Et enfin, merci à Georges de m'avoir supportée, dans tous les sens du terme.

Table des matieres

AVANT PROPOS	1
GENERALITES	4
1^{ERE} PARTIE : L'ISCHEMIE REPERFUSION CEREBRALE	5
I. Ischémie	5
I.a. Les accidents vasculaires cérébraux.....	5
I.a.1. Définition.....	5
I.a.2. AVC hémorragiques	5
I.a.3. AVC ischémiques: L'ischémie reperfusion cérébrale (IRC).....	6
I.b. Facteurs de risques.....	6
I.c. Etiologie	9
I.d. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale.....	10
I.e. Mécanismes délétères.....	13
I.e.1. Excitotoxicité	13
I.e.2. Dépolarisation péri-infarctus.....	14
I.e.3. Stress oxydant.....	14
3. a) Conséquences moléculaires du stress oxydant	16
3. b) Radicaux libres oxygénés dans le cerveau	18
I.e.4. Inflammation post-ischémique.....	20
I.e.5. Apoptose	23
I.f. Conséquences de l'ischémie cérébrale humaine	26
I.f.1. Conséquence cellulaire : L'œdème cérébral.....	26
I.f.2. Conséquences cliniques	27
I.g. Thérapeutiques existantes.....	27
I.g.1. Traitement préventif.....	29
I.g.2. Traitement curatif	30
2. a) La fibrinolyse.....	30
2. b) Les traitements neuroprotecteurs	31
I.g.3. Echec de la neuroprotection.....	33
2EME PARTIE : LA PROTEINE DISULFIDE ISOMERASE (PDI)	34
I. Aspect général de la PDI	34
I.a. Importance des ponts disulfures	35
I.b. Structure de la PDI.....	36
I.c. Rôles de la PDI.....	39
I.c.1. Activité oxydoréductase	40
I.c.2. Activité isomérase	42
I.c.3. Activité chaperonne	43
I.c.4. Activité anti-chaperonne.....	44

<i>II. Induction de la PDI : L'alcool 4-hydroxybenzylique</i>	46
II.a. Origine du 4-HBA.....	46
II.b. Synthèse chimique du 4-HBA.....	46
II.c. Utilisation de 4-HBA.....	48
II.d. Neuroprotection.....	50
II.e. Toxicité du 4-HBA.....	51
<i>III. Inhibition de la PDI : la bacitracine</i>	52
III.a. Structure.....	52
III.b. Inhibition de la PDI.....	52
III.c. Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries.....	53
III.d. Toxicité.....	53
3^{EME} PARTIE : PDI ET IRC	54
PRESENTATION DU TRAVAIL	56
MATERIEL ET METHODES	59
<i>I. Animaux</i>	60
<i>II. Substances chimiques utilisées</i>	60
<i>III. Composés dérivés du 4-HBA évalués</i>	60
III.a. Rôle de la position du groupement hydroxyle sur le cycle aromatique.....	60
III.b. Rôle du cycle aromatique : évaluation des analogues linéaires du 4-HBA.....	61
<i>IV. Anesthésie</i>	62
<i>V. Ischémie reperfusion cérébrale : modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO)</i>	62
<i>VI. Sacrifice</i>	63
<i>VII. Histologie</i>	63
<i>VIII. Coloration des coupes</i>	64
<i>IX. Quantification</i>	65
<i>X. Extraction et dosage des protéines par la méthode de Peterson</i>	66
<i>XI. Western Blot</i>	68
XI.a. Electrophorèse et transfert de protéines.....	68
XI.b. Immuno-détection de l'actine.....	69
XI.c. Immuno-détection de PDI.....	69
XI.d. Quantification.....	69
<i>XII. Rotarod</i>	70
<i>XIII. Modèle de crises audiogènes</i>	71
XIII.a. Animaux.....	71
XIII.b. Régime.....	71
XIII.c. Test audiogène.....	71
XIII.d. Administration des produits.....	72

<i>XIV. Analyse statistique</i>	72
<i>XV. Protocoles</i>	73
XV.a. Protocoles appliqués lors de l'IRC.....	73
XV.a.1. Effet du 4 HBA dans l'IRC.....	73
XV.a.2. Effet de la bacitracine dans l'IRC.....	73
XV.a.3. Effet des isomères de position, des analogues linéaires.....	74
XV.a.4. Effet de la 6-HFN dans l'IRC.....	74
XV.b. Protocoles appliqués lors des western blots.....	74
XV.b.1. Comparaison de l'induction de PDI par 4-HBA et par l'ischémie.....	74
XV.b.2. Cinétique d'induction de PDI par 4-HBA.....	75
XV.b.3. Effet de la bacitracine, de 2-HBA et 3-HBA et de la 6-HFN.....	75
XV.c. Protocoles appliqués lors des tests de la barre tournante (rotarod).....	75
RESULTATS	76
<i>I. Etude de la 4-HBA, inducteur de PDI</i>	77
I.a. Ischémie reperfusion cérébrale.....	77
I.a.1. Effet protecteur de 4-HBA.....	77
I.a.2. Effet anti-œdémateux.....	79
I.b. Effet sur PDI.....	80
I.b.1. Effet de l'IRC sur PDI en comparaison de 4-HBA.....	80
I.b.2. Cinétique d'induction de PDI par 4-HBA.....	81
I.c. Test de la barre tournante - Rotarod (toxicité minimale).....	82
I.d. Modèle de crise audiogène chez la souris déficiente en magnésium.....	84
I.d.1. Description du modèle.....	84
I.d.2. Résultats.....	85
<i>II. Etude de la 6-HFN</i>	86
II.a. Ischémie reperfusion cérébrale.....	86
II.a.1. Effet protecteur de 6-HFN.....	86
II.a.2. Effet anti-œdémateux de 6-HFN.....	87
II.b. Effet sur PDI.....	88
II.c. Modèle des crises audiogènes (chez la souris déficiente en magnésium).....	89
<i>III. Etude de la bacitracine, inhibiteur de PDI</i>	89
III.a. Ischémie reperfusion cérébrale.....	90
III.a.1. Effet protecteur de la bacitracine.....	90
III.a.2. Effet anti-œdémateux.....	91
III.b. Effet sur PDI.....	92
<i>IV. Etude des isomères de position de 4-HBA</i>	94
IV.a. Ischémie reperfusion cérébrale.....	94
IV.a.1. Effet protecteur des isomères de position.....	94
IV.a.2. Effet anti-œdémateux.....	95
IV.b. Effet sur PDI.....	96

V. Etude des analogues linéaires de 4-HBA.....	98
V.a. Ischémie reperfusion cérébrale.....	98
V.a.1. Effet protecteur des analogues linéaires	98
V.a.2. Effet anti-œdémateux.....	99
ARTICLE.....	100
DISCUSSION.....	101
I. Analyses des résultats	103
I.a. L'induction de la PDI impliquée dans la neuroprotection par 4-HBA	103
I.b. Potentiel anti-œdémateux de PDI.....	104
I.c. Neurotoxicité de 4-HBA.....	105
I.d. 4-HBA dans le modèle de crises audiogènes	105
I.e. Structure chimique requise dans l'effet neuroprotecteur et dans l'induction de la PDI	106
I.f. Effet de la 6-HFN dans l'IRC et sur PDI.....	109
II. L'activation de la PDI dans la neuroprotection.....	110
III. PDI et maladies neurodégénératives.....	114
III.a. Repliement des protéines et maladies neurodégénératives	114
III.b. PDI et neuroprotection dans Alzheimer et Parkinson	115
IV. Conclusion et perspectives.....	117
BIBLIOGRAPHIE	119

Liste des abréviations

2-HBA : alcool 2-hydroxybenzylique

3-HBA : alcool 3-hydroxybenzylique

4-HBA : alcool 4-hydroxybenzylique

6-HFN : 6-hydroxyflavone

A β : protéine amyloïde β

AED : composé anti-épileptique

APP : amyloid precursor protein

ATF6 : activating transcription factor 6

AVC: accident vasculaire cérébral

BD: 1,4-butanediol

BHE: barrière hémato-encéphalique

CAD: caspase activated deoxyribonuclease

CAM: molécule d'adhésion

CAT: catalase

DE₅₀ : dose efficace 50

DMSO : diméthylsulfoxyde

ERAD : dégradation associée au réticulum endoplasmique

ERO1 : endoplasmic reticulum oxydoreductase

GSH/GSSG : glutathion réduit/oxydé

GPx : glutathion peroxidase

GeB : Gastrodia elata Blume

H₂O₂ : peroxide d'hydrogène

IL : interleukine

IRC : ischémie reperfusion cérébrale

IRE1 : inositol requiring enzyme 1

MCAO : modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne

MDDAS : crise audiogène dépendante d'une déficience en magnésium

NF κ B : nuclear factor κ B

NOS : NO synthétase

NO : oxyde nitrique

O₂⁻ : anion superoxyde

OH[•] : radical hydroxyle

OH⁻ : anion hydroxyle

ONOO⁻ : peroxydinitrite

PBS : phosphate buffered saline

PD : 1,5-pentanediol

PDI : protéine disulfide isomérase

PERK : PKR-like ER protein kinase

PS-1 et -2 : préséniline 1 et 2

RE : réticulum endoplasmique

ROS : espèce réactive de l'oxygène

rt-PA : activateur de plasminogène tissulaire

SNO-PDI : PDI S-nitrosylée

SOD : superoxyde dismutase

TD₅₀ : dose minimale moyenne neurotoxique

TNF α : tumor necrosis factor α

UPR : unfolded protein response

AVANT PROPOS

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la seconde cause principale de mortalité après les maladies coronaires et la cause majeure de handicap dans le monde (Donnan et al., 2008). Ils représentent un problème majeur de santé publique en raison de leur fréquence, de leur mortalité, et des handicaps physiques et cognitifs qu'ils entraînent. Plus de la moitié des sujets ayant eu un accident vasculaire cérébral gardent un handicap physique ou intellectuel permanent.

Leurs fréquences augmentent avec l'âge : 78% des AVC surviennent après 75 ans (Frénisy et al., 2005). Puisque l'âge moyen de la population va en s'accroissant, l'incidence de cette pathologie va grandement s'amplifier dans les vingt prochaines années, particulièrement dans nos pays industrialisés. De plus, une recrudescence des AVC chez des patients jeunes (30–35 ans) repose sur d'autres étiologies (Leys et al., 2004).

Les séquelles de cette pathologie sur les patients se traduisent par des dommages souvent irréversibles, conduisant à un handicap sévère rendant la vie quotidienne des malades difficiles. Face à un tel problème de santé, il est important de disposer d'approches thérapeutiques efficaces. 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) (Donnan *et al.*, 2008).

Au vu du manque de solution thérapeutique disponible, la recherche de nouvelles voies pharmacologiques pour agir dans le cadre des AVC reste un sujet en constante évolution. Dans cette perspective, mieux appréhender la diversité des mécanismes physiopathologiques cellulaires et moléculaires mis en jeu dans la mort neuronale d'origine ischémique, et conduisant au handicap associé à l'AVC devrait dégager de nouvelles cibles pharmacologiques. Le stress oxydant, lié à la libération

excessive de radicaux libres, constitue une des voies physiopathologiques conduisant à la mort neuronale dans de telles pathologies.

Les accidents vasculaires cérébraux sont de deux types : les accidents hémorragiques qui représentent 20% des AVC et les accidents ischémiques qui représentent 80% des AVC, et sur lesquels se focalisera ma thèse. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à une voie neuroprotectrice dans l'ischémie reperfusion cérébrale mettant en jeu le stress oxydant. Une recherche des marqueurs de stress oxydant au cours de l'ischémie cérébrale faisait l'objet du projet Neuronox : « Modulation pharmacologique des marqueurs de stress oxydant au cours du processus de mort neuronale ». Cette étude a mis en évidence l'induction de la Protéine Disulfide Isomérase (PDI) au cours de l'ischémie cérébrale, une protéine impliquée dans le repliement correct des protéines et la formation de ponts disulfures.

En vue de caractériser l'effet de différents agents antioxydants sur le stress oxydant dans l'ischémie cérébrale, des molécules inductrices ou inhibitrices de cette PDI ont été évaluées. L'optimisation de la stratégie protectrice par induction de la PDI a été développée par la recherche d'une meilleure connaissance des synergies possibles entre agents pharmacologiques et mise en évidence de nouvelles cibles pharmacologiques. Dans ce but, des molécules isomères de la molécule inductrice de la PDI ont été développées

Avant de développer les résultats obtenus, je présenterai en introduction l'ischémie et les principaux mécanismes délétères intervenant dans cette pathologie. Ensuite je détaillerai les mécanismes moléculaires et physiologiques liés au stress oxydant, puis le projet Neuronox, qui est à la base de ce travail sera brièvement exposé. La PDI sera revue au niveau de sa structure et de ses fonctions enzymatiques. Et pour terminer cette introduction je présenterai des molécules qui ont été utilisées dans nos études, notamment l'alcool 4-hydroxybenzylique, l'inducteur de la PDI, et la bacitracine, son inhibiteur.

GENERALITES

1^{ère} PARTIE : L'ischémie reperfusion cérébrale

I. Ischémie

I.a. Les accidents vasculaires cérébraux

I.a.1. Définition

Même si le cerveau humain ne représente que 2% du poids total du corps, environ 20% du sang pompé par le cœur se dirige vers le cerveau (Doyle *et al.*, 2008), lequel est extrêmement sensible à toute interruption d'apport en oxygène. L'accident vasculaire cérébral (AVC) ou infarctus cérébral est causé par une interruption ou une réduction sévère du flux sanguin dans un territoire vasculaire précis et peut porter atteinte aux fonctions du cerveau. S'il est trop long, il peut entraîner la mort des cellules cérébrales dans la partie du cerveau touché. Si l'apport de sang et d'oxygène est suspendu trop longtemps, des réactions chimiques en chaîne, déclenchées par la privation d'oxygène, contribuent à la mort du tissu cérébral. Elles entraînent différentes altérations cérébro-vasculaires, provoquant des perturbations physiologiques du fonctionnement cérébral en rapport avec la localisation de la zone du cerveau touchée et la sévérité de l'atteinte. Il existe deux types d'AVC : un AVC ischémique ou un AVC hémorragique. Les séquelles d'un AVC dépendent de la région endommagée et de l'étendue des dommages.

I.a.2. AVC hémorragiques

Les AVC hémorragiques regroupent les hémorragies primitives cérébrales (environ 15% des AVC) et les hémorragies cérébro-méningées (environ 5 % des AVC). Les AVC hémorragiques représentent environ 15 – 20% de l'incidence des AVC aigus (Rosamond *et al.*, 2008 ; Zaleska *et al.*, 2009). Ils résultent de la rupture d'un vaisseau sanguin éventuellement liée à un anévrisme ou consécutive à des dissections (lésion directe de l'artère carotide ou vertébrale), des malformations artérielles (dysplasies) favorisées par l'hypertension ou par un traitement anti-thrombotique, ou des anomalies généralement héréditaires (facteurs de coagulation). Les AVC de type hémorragique ne seront pas approfondis lors de ce travail, celui-ci portant exclusivement sur les AVC de type ischémique.

I.a.3. AVC ischémiques: L'ischémie reperfusion cérébrale (IRC)

Les AVC ischémiques constituent environ 75 – 85% de tous les AVC (Rosamond *et al.*, 2008 ; Zaleska *et al.*, 2009). L'attaque cérébrale ischémique résulte d'une réduction temporaire ou permanente du flux sanguin cérébral qui est restreint au territoire de l'artère cérébrale majeure, entraînant des altérations du tissu cérébro-vasculaire. La réduction du flux est dans la plupart des cas provoquée par l'occlusion d'une artère cérébrale soit par un embolie soit par une thrombose locale (Dirnagl *et al.*, 1999 ; Zaleska *et al.*, 2009). Un embolie représente tout corps étranger ou anormal susceptible de circuler dans les vaisseaux de l'organisme et d'être bloqué dans la lumière des vaisseaux, provoquant de ce fait un ralentissement voire un arrêt de la circulation. L'embolie est généralement un caillot sanguin, mais peut aussi être constitué par un agrégat de bactéries, un corps lipidique (cholestérol) et même une bulle de gaz (embolie gazeuse des plongeurs qui ne respectent pas les paliers de décompression).

I.b. Facteurs de risques

La probabilité de présenter une pathologie varie en fonction de certains paramètres qui constituent les facteurs de risque. Il existe différents facteurs « modifiables » (« corrigibles ») ou non qui accroissent le risque d'AVC (Kirshner *et al.*, 2008 ; Fatahzadeh *et al.*, 2006).

Les facteurs de risque « non modifiables » permettent de dépister les personnes à haut risque d'AVC et auprès desquelles la prévention est particulièrement importante. Ces facteurs sont :

- *l'âge avancé*
- *les antécédents familiaux d'AVC*
- *le genre*

Les femmes se montrent être moins sujettes aux lésions dues aux AVC, et le risque d'attaque cérébrale est plus faible chez les femmes en pré-ménopause en comparaison aux hommes du même âge. Cependant, l'incidence des événements cérébro-vasculaires augmente rapidement chez les femmes après la ménopause

(McCullough and Hurn, 2003). On peut y voir l'importance du facteur hormonal. En effet, la différence entre les pathologies d'AVC chez les femmes et chez les hommes est supposée être due aux hormones reproductives, comme l'œstrogène chez les femmes et la testostérone chez les hommes. Plusieurs études ont rapporté que l'œstrogène protège le cerveau de l'AVC expérimental ; alors que la testostérone produit des effets délétères sur l'AVC ischémique chez les hommes et que sa réduction exerce des effets neuroprotecteurs (Alkayed *et al.*, 1998; Hurn and Macrae, 2000; Hurn and Brass, 2003, Yang *et al.*, 2002).

Les facteurs de risque « modifiables », qui peuvent bénéficier de traitements appropriés. Ils concernent les éléments suivants.

- *Hypertension artérielle*

L'hypertension artérielle est le facteur de risque principal. Le risque relatif d'AVC est multiplié par quatre chez le sujet hypertendu, pour des chiffres supérieurs à 160 mm Hg pour la pression artérielle systolique et 95 mm Hg pour la pression artérielle diastolique. L'hypertension artérielle serait responsable de 56 % des AVC chez l'homme et de 66 % chez la femme.

Le contrôle combiné de la pression systolique et diastolique réduit l'incidence des accidents vasculaires cérébraux. La baisse de 5 à 6 mm Hg de la pression diastolique diminue de 30 à 50 % le risque d'AVC, tandis qu'une augmentation de la pression artérielle diastolique de 5 à 10 mm Hg voit le risque d'AVC s'accroître d'environ 40%.

L'hypertension artérielle est non seulement le plus important facteur de risque des AVC mais aussi une affection très fréquente. 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.

- *Diabète*

Le diabète est un facteur de risque indépendant d'AVC. Le risque relatif d'AVC lié au diabète est estimé entre 1,5 et 3. Ce risque relatif est plus élevé chez la femme (2,2 contre 1,8 chez l'homme). Par ailleurs, l'hyperglycémie est un indice de gravité

mais aussi un facteur pronostique péjoratif, dont le contrôle à la phase aiguë peut réduire la sévérité des lésions.

Les patients qui sont atteints du diabète ont une plus grande incidence d'AVC et un mauvais pronostic après l'AVC. Une modification du mode de vie ainsi qu'un traitement approprié est un aspect important dans la prévention des AVC chez les patients diabétiques (Kurukulasuriya *et al.*, 2006).

- *Obésité, hypercholestérolémie*

L'obésité, qui représente un facteur de risque commun au diabète, à l'hypertension et à l'hyperlipidémie est aussi un facteur de risque présent pour l'AVC. Le risque relatif d'AVC en cas d'hypercholestérolémie est de 1,3 à 2,9.

Des études ont pu démontrer l'existence d'un lien entre augmentation du cholestérol total, augmentation du LDL-cholestérol, diminution du HDL-cholestérol d'une part et augmentation du risque de survenue d'un accident ischémique cérébral. D'un aspect préventif, on peut estimer que les patients devraient avoir un index de masse corporelle compris entre 18.5 et 24.9 kg/m² et un tour de taille < 90 cm pour les femmes et < 100 cm pour les hommes.

Le régime alimentaire modifie d'autres paramètres reconnus comme facteurs de risque comme l'augmentation de la pression artérielle, l'obésité, l'hypercholestérolémie. Un régime riche en sodium, une faible consommation de potassium, la surcharge pondérale semblent associés à une élévation de la pression artérielle.

- *D'autres facteurs « modifiables » sont liés au style de vie*

Le tabagisme augmente le risque d'AVC. Au sein des AVC de type ischémique, il semble que la consommation de tabac ainsi que l'exposition passive, augmente le risque de survenue par artériopathie extra ou intracrânienne, mais pas par une embolie d'origine cardiaque. Les sujets qui arrêtent de fumer réduisent leur risque d'AVC d'environ 50 %, l'impact de l'arrêt de l'intoxication tabagique entraînant une diminution rapide du risque d'infarctus du myocarde et d'AVC. Il faut noter que la fréquence de l'intoxication tabagique dans la population générale en fait un facteur de risque de premier plan.

La diminution de la consommation d'alcool aide aussi à prévenir l'accident ischémique. 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 les buveurs est plus clairement établie avec peut-être une relation effet-dose.

La suppression des facteurs dont le risque est élevé et pour lesquels les études d'intervention ont montré un retentissement de leur prise en charge sur l'incidence des AVC, constitue une priorité en matière de prévention.

Pour preuve, l'Association Américaine pour le Cœur (AHA) et l'association américaine des AVC ont établi un guide dans le but de prévenir des AVC les patients qui ont un historique d'AVC ischémique ou d'attaque ischémique transitoire. Ces recommandations suivent naturellement les différents éléments passés en revue ici. Il s'agit de recommandations face aux facteurs de risques « modifiables » (Kirshner et al., 2008).

I.c. Etiologie

Plusieurs grandes causes dominent l'étiologie des AVC ischémiques (Alberts et al., 2007):

- L'athérosclérose est la cause la plus fréquente. Elle est liée à la formation d'une plaque d'athérome au niveau de l'intima du vaisseau (20–30% des cas)
- Un petit infarctus de quelques millimètres de diamètre résultant de l'occlusion d'une artériole (20–25% des cas),
- Les embolies d'origine cardiaque (15 – 20% des cas). Ces embolies proviennent d'un thrombus cardiaque lorsqu'une fibrillation auriculaire, un infarctus du myocarde ou une anomalie valvulaire est développée(e).
- La dissection artérielle. La dissection est caractérisée par la présence d'une cavité contenant du sang dans la paroi artérielle qui communique avec la lumière de l'artère. La dissection artérielle résulte du clivage initial de la paroi vasculaire par un hématome et implique le plus souvent l'artère carotide

interne ou, à un moindre degré, l'artère vertébrale. L'épaississement de la paroi artérielle par l'hématome provoque un rétrécissement pouvant aboutir à une occlusion de la lumière artérielle et se compliquer par une thrombose intraluminale, source d'embolies distales. L'origine de l'hématome est incertaine, mais il semble que l'hémorragie pourrait initialement être intrapariétale.

I.d. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale

Le cerveau intact couvre ses besoins en énergie presque exclusivement par l'oxydation du glucose (Hossman, 2006). L'interruption du débit sanguin entraîne une diminution des apports d'O₂ et de glucose au niveau du cerveau et donc à une rupture de l'équilibre énergétique. Sans énergie, le potentiel de membrane ne peut être maintenu, on observe donc une perte des gradients électrochimiques et une dépolarisation des neurones. Suivent alors une redistribution des ions et une libération excessive de neuromédiateurs et d'acides aminés excitateurs (cascade ischémique) (Pinard *et al.*, 1999). Cette cascade ischémique sera détaillée dans la suite du travail.

L'événement ischémique amène une zone lésée au niveau du cerveau. Deux zones distinctes sont observées: le cœur de l'ischémie et la zone de pénombre (Fig. 1).

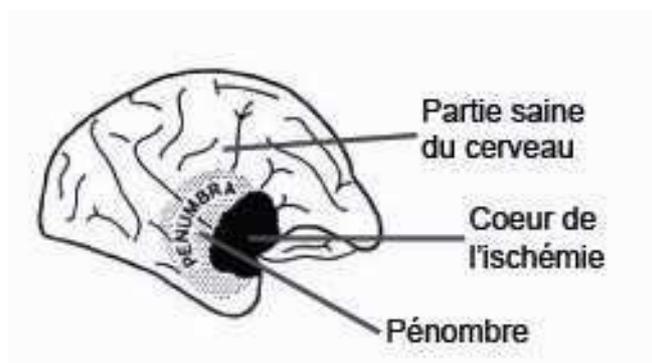


Fig. 1 : Zone de pénombre et cœur ischémique (d'après Hossman *et al.*, 2006)

De façon anecdotique, on peut souligner que la zone de pénombre porte ce nom en analogie à la zone partiellement illuminée autour de l'ombre de la lune lors d'une éclipse totale (Hossman, 2006).

Les dommages cérébraux consécutifs à l'ischémie résultent d'une séquence d'événements physiopathologiques délétères, évolutifs dans le temps et dans leur localisation (*Fig. 2*).

Au niveau du cœur de l'ischémie, l'absence totale d'apport sanguin cause aux cellules des dommages irréversibles, on y observe une zone de nécrose massive.

En ce qui concerne la zone de pénombre, le débit sanguin est diminué mais n'est pas totalement interrompu. Il semble trop faible pour qu'une activité électrique soit maintenue mais suffisant pour préserver les gradients ioniques. Même si les neurones sont fonctionnellement inactifs, ils sont structurellement intacts et restent donc viables.

L'extension de la zone du cœur ischémique est un phénomène dépendant du temps. Les cellules meurent dans les heures ou jours qui suivent une série d'évènements appelée cascade ischémique (Dirnagl *et al.*, 1999). Les mécanismes principaux de cette séquence sont l'excitotoxicité, la dépolarisation péri-infarctus qui endommagent de façon irréversible les neurones et les cellules gliales et endothéliales au sein du cœur de l'ischémie. Au niveau de la zone de pénombre, on remarque d'autres mécanismes comme le stress oxydant puis, plus tardivement l'inflammation et l'apoptose (Dirnagl *et al.*, 1999 ; Doyle *et al.*, 2008). Chacun de ces processus physiopathologiques apparaît donc à un moment défini dans le phénomène ischémique, certains arrivant après quelques minutes, d'autres après quelques heures voire jours, (Doyle *et al.*, 2008) (*Fig. 2*). Plus longtemps le flux sanguin est interrompu, plus l'extension du cœur de l'ischémie est importante au détriment de la zone de pénombre qui nécessite d'être reperfusée le plus rapidement possible. Ces faits suggèrent qu'une intervention pharmacologique rapide peut être apportée dans le but d'arrêter la mort neuronale retardée de la zone de pénombre. Malheureusement, peu de moyens d'agir sont à notre disposition, montrant tout l'intérêt de mettre en évidence de nouvelles approches pharmacologiques.

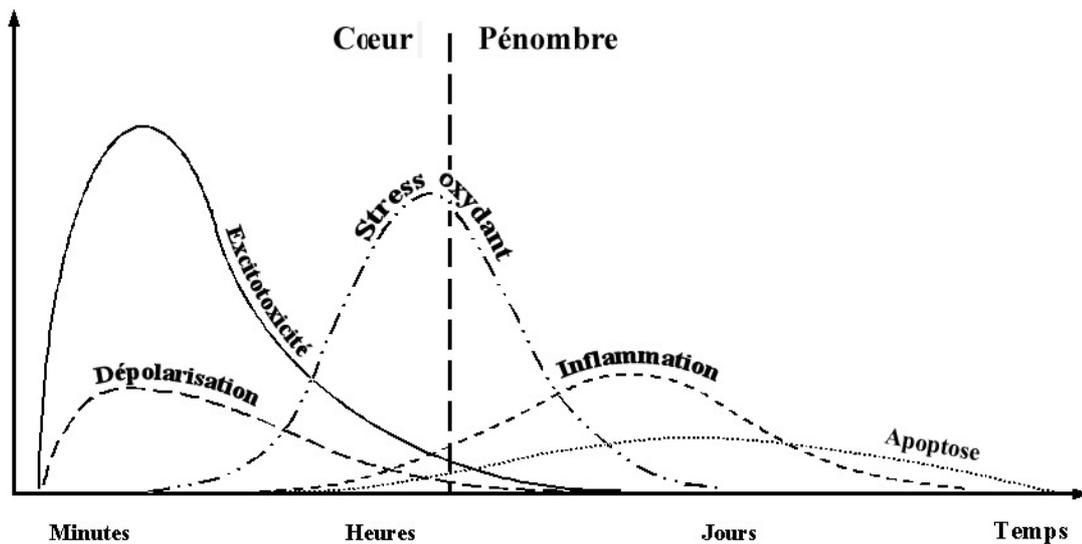


Fig. 2 : Cinétique des mécanismes impliqués dans l'ischémie cérébrale

(selon Dirnagl *et al.*, 1999)

Au niveau de la zone du cœur de l'ischémie, où le flux sanguin est le plus sévèrement restreint, l'excitotoxicité et la mort des cellules nécrotiques apparaissent après quelques minutes. A la périphérie de la zone ischémique, dans la zone de pénombre, où le flux sanguin parallèle peut limiter les effets de l'AVC, le degré d'ischémie ainsi que le délai de temps de la reperfusion détermine le devenir individuel de chaque cellule. Dans cette zone, la mort cellulaire, via des mécanismes comme l'apoptose et l'inflammation, apparaît moins rapidement (Doyle *et al.*, 2008). Peu après l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, la pénombre est approximativement de la même taille que le cœur de l'infarctus. Après 3 heures, la pénombre n'en représente plus que 50%, et entre 6 et 8 heures, presque toute la zone de pénombre a disparu et fait partie des dommages irréversibles au niveau du cœur de l'infarctus (Hata *et al.*, 2000).

Bien que la durée de l'ischémie soit un élément déterminant en ce qui concerne l'intensité des lésions, la reperfusion joue aussi un rôle important dans la distribution des dommages. Au moment de la reperfusion, une grande quantité d'oxygène arrive au niveau du cerveau, ce qui se traduit par la formation de radicaux libres (espèces activées de l'oxygène – ROS) et mène à un stress oxydant supplémentaire.

I.e. Mécanismes délétères

I.e.1. Excitotoxicité

Ce terme a été utilisé pour la première fois par Olney (Olney, 1986) pour décrire le potentiel de destruction des neurones glutamatergiques.

Le calcium constitue l'un des principaux seconds messagers au sein des cellules neuronales. Il est impliqué dans le contrôle des mécanismes de libération des neurotransmetteurs, de l'excitabilité neuronale et dans la modulation de nombreux processus métaboliques (Kristiàn et Siesjö, 1998). Le milieu extracellulaire est environ 10 000 fois plus concentré en calcium que le milieu intracellulaire. Le maintien d'une faible concentration cytosolique en calcium contre le gradient de concentration extracellulaire, est assuré, dans les conditions physiologiques, par les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ au niveau du réticulum endoplasmique ou des mitochondries, et par les transporteurs Ca^{2+} ATPase et Na^+/K^+ ATPase en parallèle à l'échangeur passif $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Neumar, 2000). La mise en jeu de ces différents systèmes est coûteuse en énergie. La déplétion énergétique induite par l'ischémie cérébrale va brusquement interrompre la régulation de cette homéostasie calcique.

Dans ces conditions, l'augmentation massive du Ca^{2+} dans la cellule va initier une cascade d'évènements délétères pour le tissu cérébral 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 cytotoxique par l'isoforme neuronale de la NO synthase (NO synthase de type I) (Bonde *et al.*, 2005 ; Krieglstein, 1997).

Cette augmentation du calcium intracellulaire est secondairement majorée, après activation des canaux calciques voltage-dépendants, par la libération de glutamate dans l'espace extracellulaire (Katsura *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 2000). Ce glutamate va alors activer des récepteurs spécifiques perméables au sodium, au potassium et au calcium, favorisant ainsi une entrée massive des ions calciques, sodiques et une sortie des ions potassiques (Neumar, 2000 ; Stone et Addae, 2002 ;

De Keyser *et al.*, 1999). La présence d'une forte concentration de glutamate au niveau extracellulaire est par ailleurs favorisée par une altération de ses mécanismes actifs de recapture pré-synaptique (Dirnagl *et al.*, 1999). De plus, le flux de calcium lui-même stimule la libération du glutamate des vésicules pré-synaptiques (White *et al.*, 2000)

I.e.2. Dépolarisation péri-infarctus

L'entrée massive de cations dans la cellule conduit à une dépolarisation membranaire se transmettant aux neurones excitateurs qui libèrent les ions potassium afin de repolariser leur membrane. La mise en jeu des récepteurs ionotropiques sensibles au glutamate entretient ce phénomène, qui se transmet de proche en proche dans le tissu cérébral. La dépolarisation péri-infarctus correspond à la propagation, dans le tissu cérébral, de ces dépolarisations membranaires répétées (Hossman, 1994), qui semblent pouvoir se reproduire plusieurs fois par heure et ce de manière prolongée (Dirnagl *et al.*, 1999) avec un effet délétère sur le tissu cérébral. Chez le rat, le nombre de ces dépolarisations est corrélé à l'importance des lésions cérébrales (Mies *et al.*, 1993). D'autre part, l'entrée massive d'ions sodium dans la cellule va être associée à un afflux de molécules d'eau, responsables d'un œdème cellulaire lui aussi cytotoxique (Ayata et Ropper, 2002).

I.e.3. 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 (radical libre). Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et les capacités antioxydantes de la cellule

L'ischémie cérébrale et la reperfusion en particulier sont responsables du stress oxydant menant à la formation de radicaux libres (Nita *et al.*, 2001), lequel aboutit à des effets délétères durant la pathogenèse (Lewen *et al.*, 2000; Chan, 2001). Le cerveau en particulier est extrêmement sensible aux attaques médiées par les radicaux libres en raison de son haut contenu lipidique. De plus, une génération excessive de radicaux libres apporte un effet préjudiciable sur l'ensemble des

fonctions physiologiques importantes pour la survie. Au moment de l'ischémie, la perturbation de l'homéostasie ionique, l'excitotoxicité, l'anoxie localisée et l'inflammation favorisent la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène par plusieurs mécanismes (Kehrer, 1993 ; Love, 1999) : i) diminution des capacités de défense antioxydantes; ii) altération du système de transformation de la xanthine en hypoxanthine (Betz *et al.*, 1991); iii) accumulation d'eicosanoïdes par induction principalement de la COX2 (Nogawa *et al.*, 1997); iv) altération de l'activité mitochondriale (Boveris, 1977); v) induction des NOS (Iadecola *et al.*, 1995).

Durant le stress oxydant, une rapide surproduction de radicaux libres submerge la détoxification et la capacité de piégeage des enzymes antioxydantes de la cellule à savoir la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), et des antioxydants non-enzymatiques à savoir la vitamine E, la vitamine C et le glutathion (GSH). Ce phénomène résulte en des dommages graves et immédiats pour les protéines cellulaires, l'ADN et les lipides (Sies, 1993; Chan, 2001). Les espèces activées de l'oxygène (ROS) qui sont particulièrement responsables du stress oxydant sont $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), NO and $ONOO^{\bullet-}$.

Lors de la reperfusion post-ischémique, la formation de radicaux libres est amplifiée par un apport d'oxygène en grande concentration. Ces radicaux libres sont donc produits en surnombre, ce qui peut saturer le système de défense antioxydant de la cellule. Cette production est donc majorée par la reperfusion (Hallenbeck et Dutka, 1990).

Les radicaux libres formés lors de la reperfusion sont principalement des espèces activées de l'oxygène (Crack *et al.*, 2005 ; Kruszewski, 2004). Les principales espèces générées sont : l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyle OH^{\bullet} , 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

3. a) *Conséquences moléculaires du stress oxydant*

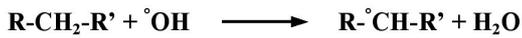
Aucune pathologie n'est initiée par le stress oxydant, mais les désordres métaboliques engendrés par toute agression (d'ordre infectieux, génétique, ischémique,...) se trouvent amplifiés lorsque l'équilibre entre production radicalaire / défenses antioxydantes est rompu au profit du stress oxydant.

Les espèces activées de l'oxygène génèrent des lésions telles que:

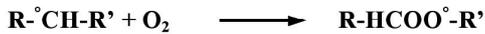
- **L'action sur les lipides**

La peroxydation lipidique consiste en une chaîne de réactions délétères présente dans tous les systèmes lipidiques. Elle est initiée par un radical, oxygéné ou non et modifie la structure moléculaire d'un lipide par une oxydation. Après l'initiation, une réaction en chaîne se propage et accélère le processus oxydant. Une réaction de recombinaison entre deux radicaux libres permet de réduire la propagation, mais le rendement est insuffisant pour stabiliser la chaîne de réactions (*Fig. 3*). Elle perturbe par conséquent l'intégrité membranaire et notamment la fluidité et la perméabilité des membranes, les échanges ioniques, les liaisons ligand-récepteurs, l'activation d'enzymes membranaires, le fonctionnement des mitochondries (gonflement mitochondrial) et le transport de l'ARNm au sein de la membrane nucléaire. Cette perte d'intégrité de la membrane aboutit à la mort cellulaire.

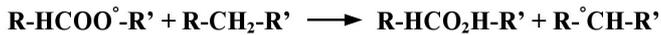
Initiation : un radical initiateur est suffisamment réactif pour arracher un hydrogène d'un groupe méthyl (CH₂) en α d'une double liaison d'un acide gras polyinsaturé (AGPI)



1. Réarrangement moléculaire conduisant à un diène conjugué
2. Combinaison avec O₂ et formation d'un radical peroxy ROO[°] très réactif



Propagation : le peroxy lipidique formé peut entretenir l'initiation en arrachant un H à un autre AGPI et propager le phénomène (3).



Terminaison : recombinaison entre deux radicaux.

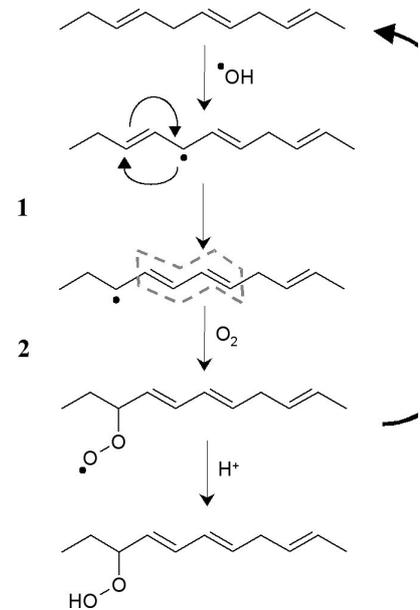


Fig. 3 : la peroxydation lipidique

▪ L'action sur les protéines

L'oxydation naturelle des protéines cytoplasmiques est un marqueur essentiel du renouvellement protéique cellulaire. En effet, des protéines spécifiques reconnaissent les sites oxydés de ces protéines et les transportent jusqu'aux lysosomes où elles sont détruites. L'oxydation excessive des protéines par les radicaux libres désorganise ce phénomène, avec comme conséquence une perte de fonction des protéines.

On observe plusieurs mécanismes au niveau même des protéines : La fragmentation des protéines au niveau des prolines, méthionines, tryptophanes ou tyrosines ; l'oxydation des cystéines en cystines ce qui mène à la formation de ponts disulfures intra- ou inter-protéines ; des transformations chimiques ; une susceptibilité à la protéolyse (changement de conformation, facilitation de dégradation par protéases).

• L'action sur l'ADN

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. Dans certains cas sévères, la cellule peut se transformer, voire perdre ses caractères spécifiques (dédifférenciation).

3. b) Radicaux libres oxygénés dans le cerveau

▪ L'anion superoxyde : $O_2^{\bullet-}$

L'anion superoxyde est ionique et radicalaire. Il est obtenu par la réduction à un électron de l'oxygène triplet, notamment par des enzymes de type xanthine oxydase. Son caractère ionique ne lui permet pas de diffuser à travers les membranes, les ions ne pouvant traverser la membrane que via des canaux perméables à ces dits ions.

L'anion superoxyde est relativement peu réactif. En milieu acide (pH=5), conditions ischémiques, il peut se protoner et donner un radical peroxyde d'hydrogène.

Les cellules endothéliales sont une source majeure d' $O_2^{\bullet-}$ en raison de leur haut niveau en xanthine oxydase (Gasche *et al.*, 2003). Dans les conditions d'ischémie, on observe un déséquilibre d'oxydation potentiellement délétère pour la barrière hémato-encéphalique.

▪ Le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée : H_2O_2

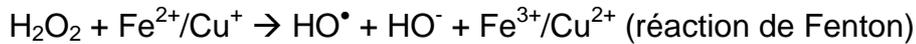
Le peroxyde d'hydrogène provient de la dismutation ou de la réduction de l'anion superoxyde sous l'action de la SOD. C'est une espèce peu réactive, diffusible et toxique.

Le taux cellulaire de H_2O_2 est contrôlé par deux enzymes :

- La glutathion peroxydase réduit H_2O_2 en H_2O
- La catalase dismute H_2O_2 en O_2

- **Le radical hydroxyle : HO•**

Le radical hydroxyle est obtenu principalement par la réaction de Fenton, via l'intervention de métaux de transition tels que le fer disponible en grande quantité dans l'organisme. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) capte un électron du fer réduit (Fe²⁺) et se scinde en deux, formant alors un anion hydroxyle et un radical HO•.



Il faut noter que le radical hydroxyle •OH et l'anion basique ⁻OH, tous deux formés au cours de cette réaction, sont deux espèces chimiques nettement distinctes, puisque l'une (⁻OH) a tous ses électrons périphériques appariés, tandis que l'autre (•OH) a un électron célibataire sur sa couche périphérique. Leur différence de réactivité est directement corrélée à cette différence de structure électronique.

Ce radical est très réactif et toxique. Il réagit non spécifiquement, immédiatement sur son lieu de formation, du fait de sa constante de vitesse de réaction rapide ($k \gg 10^{10} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). En effet, bien qu'il soit très diffusible, il ne peut parcourir plus de quelques nanomètres du lieu de sa production en raison de sa consommation instantanée.

Il n'existe pas d'enzymes pour sa détoxification. Seuls des capteurs de radicaux libres tels que la vitamine C ou la vitamine E peuvent protéger l'organisme de son agression.

- **L'oxyde nitrique: NO**

L'oxyde nitrique est un second messenger intracellulaire produit par les NO synthases, au niveau des neurones et des cellules endothéliales. Il peut réagir avec l'anion superoxyde pour donner le peroxyde nitrite ONOO⁻ (Remarque: l'affinité de O₂•⁻ est plus grande pour NO que pour la SOD). La structure instable du peroxyde nitrite favorise les réactions du stress oxydant (Guix *et al.*, 2005) et est impliquée dans l'initiation de la peroxydation lipidique durant la reperfusion (White *et al.*, 2000).

Pathophysiologiquement, le NO a deux effets opposés. Dans les cellules endothéliales, la génération de NO mène à une dilatation vasculaire, une amélioration du flux sanguin et une atténuation des lésions hypoxiques ; alors qu'au niveau des neurones, le NO contribue à l'excitotoxicité du glutamate et, par la formation de peroxynitrate, à des lésions induites par les radicaux libres (Hossman, 2006).

Des quantités excessives de NO^{*} mènent à l'apoptose neuronale *via* les processus suivants (Nomura, 2004) :

- Diminution du potentiel de la membrane mitochondriale
- Libération du cytochrome c de la mitochondrie
- Activation des caspases
- Dégradation des inhibiteurs de la caspase-activated Dnase (CAD)
- Activation de la CAD

I.e.4. Inflammation post-ischémique

La réaction inflammatoire est une composante de la réponse immune et répond à une agression d'origine exogène (infection, traumatisme...) ou endogène (cause immunologique, traumatisme tissulaire...). Elle est adaptée et contrôlée par de multiples systèmes régulateurs et s'avère souvent protectrice en participant aux processus de défense naturelle et à la réparation des lésions tissulaires.

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 (O'Neill *et al.*, 1997). 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 (Lindsberg *et al.*, 1991 ; Stoll *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 1998). Il est à noter que NF- κ B est connu comme un régulateur clé des gènes activés dans l'inflammation suivant l'ischémie cérébrale (TNF- α , IL1 β , IL6, ICAM1) (Rami *et al.*, 2008).

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).

Il existe plusieurs familles de molécules d'adhésion (CAM) :

- Les sélectines, qui médient le roulement des leucocytes sur l'endothélium. Ces sélectines sont synthétisées après stimulation par les cytokines comme TNF- α et IL1- β .
- Les immunoglobulines, qui médient l'adhésion ferme des leucocytes aux cellules endothéliales aussi bien que l'activation des leucocytes. Il existe 5 membres de la famille : ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1, MAdCAM-1
- Les intégrines, qui sont impliquées dans l'adhésion ferme du leucocyte. Elles sont activées entre autres par les cytokines.

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. L'adhésion leucocytaire est un phénomène incontournable de la mise en place de l'inflammation. Elle est constituée d'une cascade d'évènements d'adhésion et d'activation, permettant la migration du leucocyte. Cette séquence d'évènements peut être divisée en 4 étapes principales (*Fig. 4*): adhésion et roulement, activation, adhésion et migration.

Ces différentes CAM sont impliquées au niveau de l'adhésion leucocytaire. Bien que les sélectines jouent un rôle central dans l'adhésion et le roulement, les chemokines sont secrétées et activent le neutrophile, et les intégrines sont impliquées dans l'adhésion ferme.

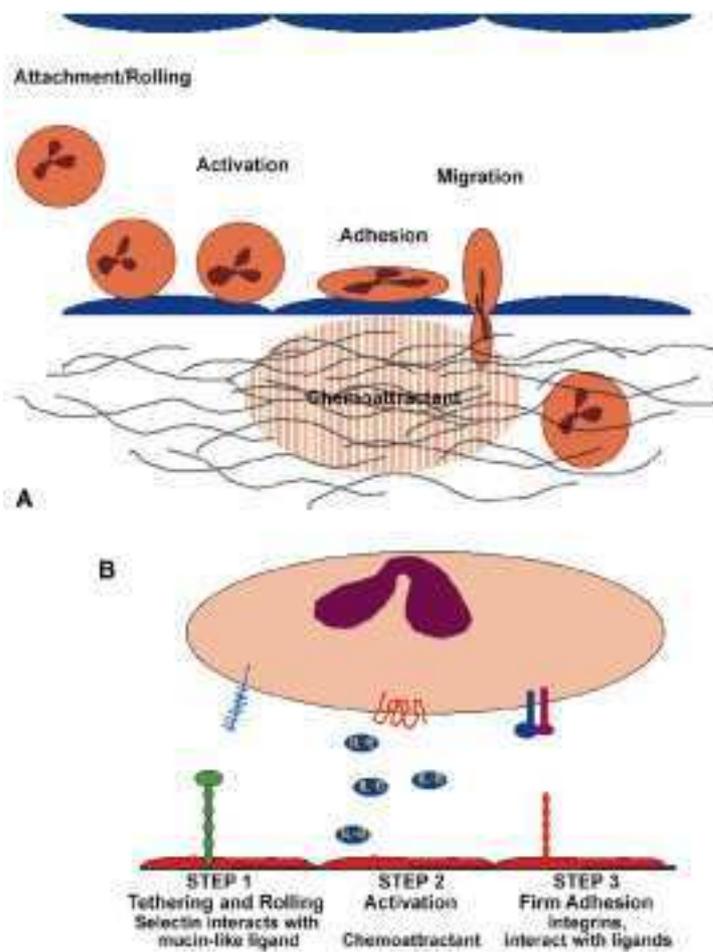


Fig. 4 : Différentes étapes du processus d'adhésion leucocytaire

Adhésion primaire transitoire et réversible : roulement du leucocyte sur la surface endothéliale, médiée surtout par les sélectines

Activation leucocytaire rapide, dépendante des chemokines

Adhésion ferme et stable à la surface endothéliale, contrôlée par les intégrines

Migration - Diapédèse: le leucocyte rampe jusqu'à atteindre un espace inter-endothélial pour s'y glisser

Les chemokines vont organiser le recrutement préférentiel de certains leucocytes en fonction du tissu concerné et des besoins.

D'après Petruzzelli et al., 1999

Chacune de ces étapes est nécessaire pour un bon recrutement des leucocytes, car le blocage d'une seule d'entre elles peut réduire très fortement l'accumulation des leucocytes dans les tissus.

Lors de l'ischémie, il y a activation rapide des cellules microgliales résidentes et infiltration des leucocytes au niveau du parenchyme lésé. Dans les heures qui suivent l'ischémie, on note une augmentation des niveaux de cytokines et de

chemokines, ce qui mène à une augmentation de l'expression des CAMs au niveau des cellules endothéliales cérébrales (Samson *et al.*, 2005). Cette augmentation facilite l'adhésion et la migration trans-endothéliale des leucocytes. Ces cellules s'accumulent dans les capillaires et altèrent le flux sanguin cérébral (Amantea *et al.*, 2009). Les leucocytes infiltrés peuvent libérer des médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines, les chemokines et ROS.

Lors de la reperfusion, les leucocytes peuvent adhérer à l'endothélium activé. Ils migrent vers le tissu cérébral et libèrent les médiateurs pro-inflammatoires. Cette réaction inflammatoire peut mener à des lésions secondaires auprès des neurones de la zone de pénombre. (Frijns *et al.*, 2002).

En raison de leurs effets sur la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, certains travaux évoquent l'hypothèse que les polynucléaires neutrophiles pourraient participer dans une large mesure à l'accentuation des lésions post-ischémiques et des complications hémorragiques, même si leur participation à la pathogénie de l'ischémie n'est pas encore bien comprise (Planas *et al.*, 1996 ; Del Zoppo et Mabuchi, 2003, Justicia *et al.*, 2003).

I.e.5. Apoptose

Ce type de mort cellulaire se différencie de la nécrose par ses aspects fonctionnels organisés et anatomiques (modification des membranes, réorganisation du cytosquelette, condensation de la chromatine, fragmentation de l'ADN et formation des corps apoptotiques). L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire qui s'est développé avec la naissance des organismes multicellulaires et constitue, en quelque sorte, un suicide.

La mort cellulaire par apoptose peut être initiée par des signaux intrinsèques. La cellule active un programme interne de destruction cellulaire en réponse à une horloge interne, à la réduction des facteurs de survie, à une perte de contact ou à des modifications hémodynamiques. Toute cellule possède l'ensemble de la machinerie suicidaire et peut s'engager dans un processus actif d'autodestruction à moins qu'elle ne soit stimulée pour l'en empêcher. D'autre part, l'apoptose peut être

initiée par de nombreux stimuli extérieurs dont l'irradiation (γ , UV), les agents de chimiothérapie, les cytokines, les lipides oxydés ou encore les bactéries et les virus.

Ce sont l'abondance et l'activité relatives des protéines et molécules pro- et anti-apoptotiques qui déterminent à un moment donné le sort (de survie ou de mort) de la cellule. 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-XL...). Il est à noter que NF- κ B est connu comme un régulateur clé des gènes activés dans l'apoptose suivant l'ischémie cérébrale (p-53, Bcl-2 et BCL-x). Dans certaines conditions pathologiques telles que l'ischémie cérébrale, la balance entre ces protéines représente la capacité de décision de la cellule et peut conduire vers la mort cellulaire (Graham et Chen, 2001).

L'apoptose se définit morphologiquement par la condensation du cytoplasme (modification des membranes et réorganisation du cytosquelette), par la marginalisation de la chromatine sous la membrane nucléaire, et l'apparition de bourgeons membranaires contenant les fragments nucléaires donnant naissance aux corps apoptotiques destinés à être phagocytés par des macrophages ou par des cellules voisines (Nakka *et al.*, 2008). Sur le plan moléculaire, l'ADN est fragmenté en multiples segments par clivage spécifique entre les nucléosomes.

Deux voies de signalisation principales ont été décrites comme étant la voie extrinsèque (ou médiée par récepteurs) ou la voie intrinsèque (ou mitochondriale) (Fig. 5) (Nakka *et al.*, 2008 ; Rami *et al.*, 2008).

La voie extrinsèque est une voie de transduction d'un signal intracellulaire vers une réponse apoptotique et est illustrée par les membres pro-apoptotiques de la superfamille des récepteurs TNF. L'activation médiée par un ligand de ces récepteurs résulte en l'activation de la pro-caspase-8 (cysteine aspartate, specific protease 8). La caspase-8 activée fonctionne comme une caspase initiatrice, menant par la suite au clivage et à l'activation des caspases effectrices, comme la caspase-3. Pour être actives, les caspases doivent être clivées au niveau des résidus

aspartate et s'assembler en hétérotétramères. De ce fait, certaines caspases sont capables de s'autoactiver. Ce mécanisme mène ainsi à la mort cellulaire.

La voie intrinsèque implique des perturbations de l'intégrité de la membrane mitochondriale, menant à la libération du cytochrome c et à l'activation de la caspase-9 initiatrice. La mitochondrie contrôle positivement ou négativement la cascade d'activation des caspases avec la libération de cytochrome c déclenchée par l'altération du potentiel membranaire mitochondrial. L'association du cytochrome c avec le facteur proapoptotique Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) va activer la caspase 9 puis d'autres caspases. D'autre part, les protéines membranaires de la famille Bcl-2 agissent au niveau de la mitochondrie pour réguler le potentiel de transition membranaire et inhiber la libération du cytochrome c (inhibition de l'activation des caspases) et du facteur inducteur de l'apoptose AIF (*apoptosis-inducing factor*). Ce dernier facteur représente une voie indépendante des caspases de dégradation de l'ADN. La décision finale mitochondriale est représentée par un équilibre des facteurs inducteurs de l'apoptose (Bcl-x_S, Bax, Bad, Bid, Bak...) et inhibiteurs (Bcl-2, Bcl-x_L, Bag-1...) de la famille Bcl-2.

La caspase 3 est l'effecteur terminal de la cascade des caspases et favorise de nombreuses voies catalytiques de l'ADN. La phase de dégradation de l'ADN est accentuée par l'inhibition des enzymes réparatrices de l'ADN telles que PARP (poly ADP-ribose polymérase) et active la libération de CAD (*caspase-activated deoxyribonuclease*) une désoxyribonucléase qui dégrade l'ADN chromosomique.

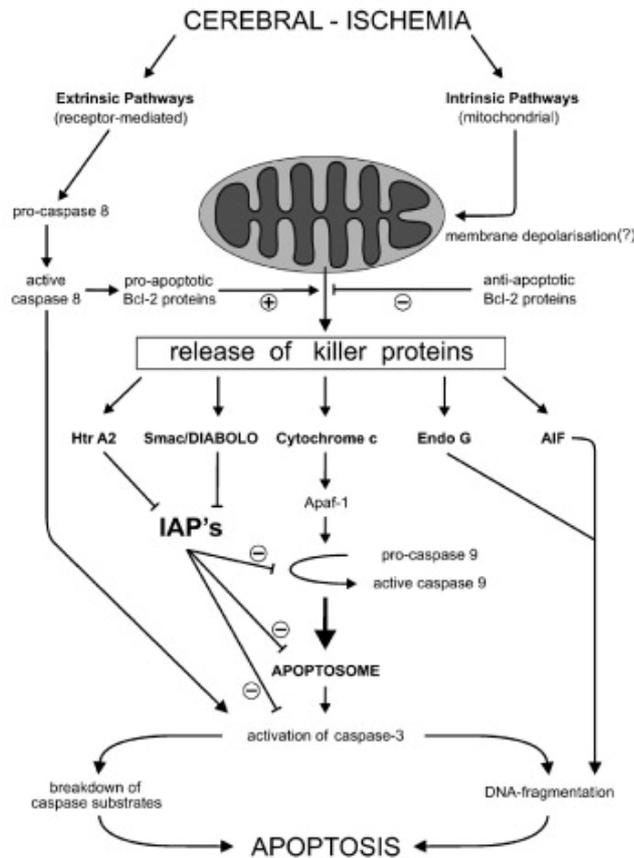


Fig. 5 : La voie intrinsèque et la voie extrinsèque de l'apoptose (d'après Rami et al., 2008)

I.f. Conséquences de l'ischémie cérébrale humaine

I.f.1. Conséquence cellulaire : L'œdème cérébral

L'ischémie cérébrale entraîne une défaillance des pompes ioniques membranaires, ce qui déclenche alors des mécanismes complexes qui vont mener au gonflement des cellules et à un œdème cérébral d'origine cellulaire : l'œdème cytotoxique. La perturbation de l'homéostasie ionique déclenche un mouvement osmotique passif d'eau vers les cellules. L'augmentation de la teneur en eau du tissu cérébral affecte la substance grise et blanche, ce qui se traduit macroscopiquement par une augmentation du volume, et donc leurs limites deviennent plus difficiles à préciser. L'œdème atteint son développement maximum le quatrième jour puis régresse au cours de la deuxième semaine. L'effet de masse est d'autant plus

important que l'infarctus est volumineux. Parallèlement, l'ischémie-reperfusion altère les vaisseaux et la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour aboutir à la formation d'un œdème dont l'origine est la fuite capillaire : l'œdème vasogénique. Lorsque l'intégrité de la BHE est perturbée, le liquide et les protéines plasmatiques ainsi que les cellules inflammatoires pénètrent dans le tissu cérébral.

La plupart des voies biologiques qui mènent à l'œdème sont présentes lors de 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.

I.f.2. Conséquences cliniques

Les conséquences des accidents vasculaires cérébraux sont dramatiques avec d'une part une mortalité élevée, et d'autre part pour ceux qui survivent, des séquelles physiques et/ou psycho-intellectuelles nécessitant souvent une prise en charge quotidienne particulièrement lourde.

Entre 24 et 53 % des patients victimes d'AVC deviennent totalement ou partiellement dépendants; 34 % développeront progressivement une démence.

Les patients victimes d'un AVC sont atteints de différentes façons suivant le type d'AVC qu'ils ont subi, le nombre de cellules touchées et la région du cerveau atteinte (paralysie, problèmes d'aphasie,...).

I.g. Thérapeutiques existantes

Même si le cœur de l'ischémie meurt rapidement suite au manque d'afflux sanguin, la pénombre ischémique peut encore être sauvée par une intervention thérapeutique rapide permettant la restauration du flux sanguin et/ou l'arrêt du processus apoptotique.

Il existe actuellement peu d'interventions cliniques thérapeutiques effectives dans le traitement aigu de l'AVC ischémique (Rahman *et al.*, 2005 ; Fatahzadeh *et al.*, 2006). De plus, l'efficacité de ces traitements est tributaire du moment de l'intervention, c'est à dire qu'il faut prendre en compte la fenêtre thérapeutique. Cette fenêtre thérapeutique est définie comme la période de temps la plus longue entre l'ischémie (occlusion du vaisseau) et le traitement médicamenteux pour laquelle un bénéfice neuroprotecteur significatif est encore observé. En fait, plus on attend avant d'administrer le traitement, moins celui-ci sera efficace; trop tardif, il pourrait même devenir délétère. La fenêtre thérapeutique est donc un élément clé dans le choix du traitement : après un délai de 3 heures, le risque d'hémorragie suite à l'administration du traitement devient important. Entre 5 et 10% des patients pourront donc bénéficier de ce type de traitement, les autres patients ne pouvant plus être candidats à certaines thérapies du fait d'une prise en charge trop tardive.

L'efficacité des traitements est aussi influencée par le déroulement dans le temps des mécanismes délétères qu'ils ciblent, puisque ces mécanismes sont des processus déterminés dans le temps. Si le traitement cible un mécanisme spécifique apparaissant à un moment donné dans l'ischémie, mais que ce traitement est donné après que ce mécanisme d'action soit apparu, le traitement ne sera pas seulement inefficace, mais pourrait aussi être potentiellement vecteur d'un déséquilibre supplémentaire et ainsi exacerber la détérioration (Rahman *et al.*, 2005).

L'évolution des interventions thérapeutiques doit changer, pour s'adapter à la progression de la maladie. En thérapie aiguë, si le caillot sanguin est toujours présent, la fibrinolyse semble la plus appropriée. Alors que, une fois la recanalisation restaurée, un agent neuroprotecteur est requis, puisque la plupart des dommages neurologiques associés à l'ischémie cérébrale est attribuée au stress oxydant causé par la reperfusion (Hill *et al.*, 1998).

Tout ceci explique qu'actuellement encore, l'élément essentiel de l'attitude thérapeutique vise la prévention, puisqu' une fois l'accident ischémique survenu, les ressources thérapeutiques deviennent limitées.

I.g.1. Traitement préventif

- Prévention primaire :

Un élément essentiel de la lutte contre les AVC est la prévention. La prévention doit avant tout prendre en compte les nombreuses étiologies des AVC qui requièrent chacune une stratégie préventive spécifique.

La majorité des AVC de type ischémique lié à l'athérosclérose est due au développement, sur une plaque d'athérome, d'un thrombus qui peut soit se fragmenter et devenir source d'embolies distales, soit s'accroître et aboutir à une occlusion de l'artère. Le traitement préventif primaire sera basé sur le dépistage et le traitement des facteurs de risque (essentiellement l'hypertension artérielle) pour tenter de prévenir la formation de la plaque d'athérome.

- Prévention secondaire:

L'utilisation des traitements antithrombotiques (aspirine et antiplaquettaires) (Wilterdink *et al.*, 2001) est plus efficace en prévention secondaire qu'en prévention primaire et permet de lutter contre les récurrences par des processus thrombo-emboliques secondaires. Dans les cas très sévères de sténose ou anomalies artérielles particulières, un acte chirurgical (endartérectomie carotidienne principalement) peut être pratiqué à titre préventif. Par ailleurs, la prévention des accidents vasculaires cérébraux 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. La prévention des hémorragies cérébrales quant à elle, repose essentiellement sur le traitement de l'hypertension artérielle qui multiplie par 10 le risque d'hémorragie. L'utilisation incorrecte des anticoagulants en particulier chez le sujet hypertendu ou ayant eu un accident ischémique cérébral, peut parfois être une cause non négligeable d'hémorragie cérébrale.

Des méthodes non-médicamenteuses (régimes moins riches en sel, diminution de la consommation d'alcool, arrêt du tabac, exercice physique, contrôle du diabète,...) destinées pourront également permettre d'améliorer les différents facteurs de risques et ainsi diminuer le risque d'AVC. Cette procédure est d'autant

plus efficace que ces mesures de prévention sont mises en œuvre le plus précocement possible.

I.g.2. Traitement curatif

L'utilisation de traitement curatif apparaît à la suite d'un premier AVC. Les thérapeutiques curatives de la phase aiguë de l'infarctus cérébral restent encore peu nombreuses. Le but du traitement est de réduire le handicap et la mortalité des infarctus cérébraux. Pour cela les thérapeutiques tentent de limiter l'extension des lésions cérébrales et de lutter contre l'occlusion vasculaire.

Il existe deux classes principales d'approches thérapeutiques face aux AVC ischémiques aigus (Zaleska *et al.*, 2009):

- les agents neuroprotecteurs ciblant les voies biochimiques qui contrôlent le destin cellulaire en vue de préserver les fonctions cérébrales et/ou d'améliorer la réparation et la récupération neuronale;
- la fibrinolyse qui restaure le flux sanguin cérébral.

2. a) *La fibrinolyse*

La fibrinolyse correspond à la dégradation de la fibrine par la plasmine, conduisant à un délitement du caillot. Le principe de la fibrinolyse pharmacologiquement induite repose sur l'accélération et l'amplification de la fibrinolyse physiologique

Ces traitements visent à améliorer la reperfusion en brisant le thrombus occlusif et en rétablissant le flux sanguin cérébral. Si la thrombolyse, et donc la recirculation, est retardée, le résultat thérapeutique dépend de la progression du cœur ischémique vers la pénombre avant l'initiation de la reperfusion. Cela explique que l'effet thérapeutique diminue avec l'augmentation du délai d'administration, jusqu'à ce qu'une amélioration ne puisse plus être attendue, après 3 à 6 heures (Brinker *et al.*, 1999).

Actuellement, la seule molécule ayant l'indication de fibrinolyse à la phase aiguë de l'infarctus cérébral est le rtPA ou activateur tissulaire recombinant du

plasminogène. Le rt-PA se lie à la fibrine au niveau du thrombus et convertit le plasminogène en plasmine, lequel aide à briser le réseau de fibrine (Rahman *et al.*, 2005). Le rt-PA ne peut activer le plasminogène qu'en présence de fibrine, ce qui lui confère une spécificité d'action sur le caillot constitué. On note deux limites majeures à son utilisation au cours de l'ischémie cérébrale : une étroitesse de la fenêtre thérapeutique et un risque d'hémorragie (Zaleska *et al.*, 2009). Tout récemment l'étude ECASS 3 a permis d'étendre la fenêtre thérapeutique du rtPA de 3h à 4h30 (Hacke *et al.*, 2008).

Malheureusement, même si ces agents reperfusent le tissu ischémié, ils n'aident guère à la neuroprotection. Une solution pour pallier à ce problème consiste à combiner traitements thrombolytiques et neuroprotecteurs, ces derniers visant à minimiser la détérioration neurologique post-ischémique.

2. b) *Les traitements neuroprotecteurs*

La neuroprotection peut être définie comme toute stratégie, ou combinaison de stratégies, qui inhibe, interrompt ou ralentit les événements délétères cellulaires ou moléculaires qui, laissés incontrôlés, pourraient conduire à des lésions ischémiques irréversibles (Ginsberg *et al.*, 2008). La neuroprotection exclut les thérapeutiques qui visent à agir directement sur l'obstruction artérielle.

Les agents neuroprotecteurs ont pour cibles les différents mécanismes délétères apparaissant dans l'ischémie cérébrale, dans le but de limiter l'extension du cœur ischémique. Il existe un nombre important de types d'agents neuroprotecteurs qui ont été étudiés à différentes phases d'essais cliniques, en se basant sur des modèles expérimentaux reproduisant la pathologie vasculaire cérébrale et sur les mécanismes physiopathologies (excitotoxicité, stress oxydant,...). Quelques uns seront ici décrits brièvement

Plusieurs types d'antioxydants ont été étudiés. Parmi ceux-ci, nous pouvons noter l'edaravone, l'ebesen et le tirilazad qui sont des piègeurs de radicaux libres. L'edaravone inhibe la peroxydation lipidique et les lésions cellulaires endothéliales in vitro, ainsi qu'il améliore l'œdème cérébral in vivo (Edaravone Acute Infarction Study Group, 2003). L'ebesen réagit avec le peroxy-nitrite et inhibe une variété d'enzyme

comme les lipoxigénases, les NO synthases (Parnham *et al.*, 2000). Le tirilazad est un inhibiteur de la peroxydation lipidique (Ginsberg *et al.*, 2008). Une molécule récente chélatrice des radicaux libres, le NXY-059, a été le sujet de plusieurs études cliniques. Une de ces études montrait que la NXY-059 diminuait le handicap indépendamment de la sévérité de l'ischémie et du délai de traitement (Green, 2008).

Le calcium joue un rôle important dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. Le blocage des canaux calciques au niveau du cerveau réduirait l'entrée du calcium dans les neurones, ce qui aurait potentiellement une action salutaire dans l'ischémie cérébrale en intervenant au niveau du mécanisme d'excitotoxicité (Ginsberg *et al.*, 2008).

Le glutamate est un le principal neuromédiateur excitateur capable d'induire des effets cytotoxiques. Il interagit avec les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et AMPA (acide 3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique), qui sont tous deux des cibles pertinentes dans la neuroprotection. Des antagonistes du glutamate pourraient fournir une neuroprotection. Le lubéluzole est un composé qui prévient l'augmentation du glutamate extracellulaire, normalise la balance ionique dans la zone de pénombre et inhibe la production de NO activée par le glutamate (Grotta , 1997). Il y a malgré tout un manque de développement de cette classe d'agents antagoniste des récepteurs glutamate, dû à la nature hyper-aiguë des événements qui permettent le relargage du glutamate, ce qui exclut leur utilisation effective en clinique (Zaleska *et al.*, 2009).

Certains neuroprotecteurs ciblent l'événement inflammatoire. La réponse inflammatoire après un événement ischémique est marquée par une infiltration leucocytaire (monocytes et neutrophiles) et par l'activation de la microglie, des astrocytes et des cellules endothéliales dans les heures et les jours qui suivent l'ischémie. La sur-régulation et la libération de cytokines inflammatoires induisent des lésions par rupture de la BHE et de la matrice extracellulaire. Cela mène à un œdème de type vasogénique. La famille des protéines tyrosine kinase s'est montrée réguler plusieurs de ces processus via une phosphorylation directe de la matrice cellulaire (Zaleska *et al.*, 2009). Cibler ces kinases soit génétiquement soit par des

petites molécules inhibitrices résulte dans la neuroprotection dans un modèle d'attaques cérébrales chez le rongeur (Paul *et al.*, 2001).

Réduire les niveaux des cytokines inflammatoires IL-1 et TNF- α devrait fournir une bonne stratégie pour améliorer les résultats des attaques cérébrales, car ces molécules jouent un rôle majeur dans les lésions apparaissant au niveau du tissu cérébral. Une MCAO transitoire ou permanente induit une augmentation de la libération d'IL-1 par la microglie, les astrocytes et les neurones. On suppose qu'IL-1 induit les dommages cérébraux en stimulant la libération d'acide arachidonique, augmentant par là l'expression des NOS et l'excitotoxicité du glutamate (Simi *et al.*, 2007).

I.g.3. Echec de la neuroprotection

Même si les pistes explorées par ces différents essais étaient des plus prometteuses, la plupart de ces molécules n'ont, en définitive, pas montré d'efficacité significative, ou alors une efficacité limitée, et se sont même parfois montrées délétères (Ginsberg *et al.*, 2008, Zaleska *et al.*, 2009).

Ces échecs se traduisent par plusieurs facteurs :

- Les différences physiologiques entre les rongeurs et l'homme.
- Les différences entre les ischémies cérébrales expérimentales et les AVC spontanés chez les patients.
- Certaines raisons attribuables à la pharmacologie, aux mécanismes d'actions et au protocole d'administration du composé.

Le manque évident de solution thérapeutique disponible pour faire face aux accidents vasculaires cérébraux et à l'échec au niveau des traitements neuroprotecteurs conduit logiquement à la recherche de nouvelles cibles pharmacologiques dans l'IRC. De ce point de vue, la protéine disulfide isomérase pourrait être une approche intéressante.

2ème PARTIE : La protéine disulfide isomérase (PDI)

I. Aspect général de la PDI

Il s'était avéré que la surexpression de la PDI avait, par des mécanismes inconnus, un rôle neuroprotecteur contre l'hypoxie dans les neurones (Tanaka *et al.*, 2000).

Parmi les aides au repliement des protéines retrouvées au sein du RE, la PDI a été la première protéine catalyseur du repliement des protéines répertoriée il y a 40 ans d'ici (Goldberger *et al.*, 1963). C'est une protéine de 57 kDa, localisée principalement au niveau du réticulum endoplasmique des cellules eucaryotes. La PDI est connue pour posséder plusieurs activités bien déterminées, à savoir les activités oxydoréductase, isomérase, chaperonne et antichaperonne. Ces différentes activités prennent place dans la réponse UPR (Unfolded Protein Response). De plus, ces activités pourraient expliquer l'effet neuroprotecteur observé lors de l'augmentation de la PDI en condition ischémique.

Pour augmenter la capacité de traitement des protéines non repliées produites après un stress, le réticulum endoplasmique (RE) initie une voie de signalisation qui augmente la transcription des gènes de transcription des chaperonnes moléculaires et « éteint » la traduction des protéines. Ce processus de régulation médié par le RE est appelé réponse UPR.

L'ischémie cérébrale induit une accumulation toxique de protéines non repliées dans les neurones fragilisés. Dans cet état de stress, le nombre de protéines non repliées excède la capacité des chaperonnes moléculaires et des enzymes de repliement. Lors de l'ischémie cérébrale, une augmentation de la PDI comme protéine chaperonne et enzyme du repliement est observée, et considérée comme élément de cette réponse UPR (Truettner *et al.*, 2009).

Pour mieux pouvoir comprendre les différents rôles de la PDI au sein du RE, nous allons tout d'abord nous attarder sur l'importance des ponts disulfures au sein des protéines ainsi que sur la structure de cette PDI. Ensuite nous verrons les

molécules influençant la PDI, c'est à dire l'alcool 4-hydroxybenzylique qui induit la PDI, ainsi que la bacitracine, un antibiotique qui inhibe la PDI.

1.a. Importance des ponts disulfures

Les ponts disulfures sont des liens covalents formés entre deux résidus cystéines dans les protéines, et dont la fonction première est de stabiliser la structure repliée de la protéine. En fait, durant le repliement de la protéine, les ponts disulfures peuvent réduire la flexibilité du polypeptide, donnant une direction au processus de repliement, et peuvent fournir une stabilité supplémentaire à la protéine repliée (Christis *et al.*, 2008).

Comme chaque cystéine dans une protéine a le potentiel de former un pont disulfure avec une autre cystéine, soit de façon intramoléculaire, soit de façon intermoléculaire, la formation correcte des ponts disulfures natifs est souvent l'étape limitative dans le repliement des protéines *in vitro* et *in vivo* (Creighton *et al.*, 1995; Molinari *et al.*, 1999). Un mauvais repliement des protéines peut mener à une perte fonctionnelle de la protéine, mais peut aussi interférer avec la fonction cellulaire, par la formation d'agrégats de protéines mal ou non repliées. De plus, cette erreur de repliement prend place dans de nombreuses pathologies (Dobson, 2001) comme la maladie d'Alzheimer (Harper *et al.*, 1997), le goitre (Kim *et al.*, 1996), ou encore l'emphysème (Cabral *et al.*, 2001). Les protéines qui échouent à acquérir leur conformation native, à cause d'erreur génétique, de stress cellulaire ou d'événements stochastiques, peuvent endommager la cellule.

Les ponts disulfures sont présents dans près d'un tiers de toutes les protéines humaines repliées dans le RE et qui traversent les voies de sécrétion comme l'appareil de Golgi (Chen *et al.*, 2005 ; Ghaemmaghani *et al.*, 2003). La synthèse et le repliement de ces protéines prennent place dans le RE, où l'environnement est favorable à la formation de ponts disulfures. Vu ce grand flux de protéines à travers le RE et vu que le repliement des protéines multi-domaines est complexe, la lumière du RE contient une grande concentration de chaperonnes moléculaires qui maintiennent la solubilité des polypeptides, d'enzymes qui modifient les protéines post-translotionnellement, et de facteurs qui assistent directement le repliement de polypeptides nouvellement synthétisés. Par conséquent, la lumière du RE est aussi

reconnue comme un compartiment spécialisé dans le repliement des protéines (Nakatsukasa *et al.*, 2008).

La formation de ponts disulfures n'est pas spécifique au RE, mais peut aussi intervenir dans les bactéries Gram-négative (Kadokura *et al.*, 2003), dans la mitochondrie (Mesecke *et al.*, 2005; Koehler *et al.*, 2006) et à l'extérieur de la cellule (Ahamed *et al.*, 2006). De plus, il y a un nombre, petit mais grandissant, d'exemples de formation de ponts disulfures dans le cytoplasme (Paget *et al.*, 2003).

La cellule utilise donc un grand nombre de mécanismes pour se protéger contre un mauvais repliement des protéines. Parmi ces mécanismes, l'on peut citer les protéines chaperonnes ainsi que les protéines catalyseurs du repliement, comme la PDI. Celles-ci inhibent l'agrégation des protéines, stimulent leur repliement et dégradent les protéines qui n'ont pas réussi à se replier correctement (Wilkinson *et al.*, 2004).

1.b. Structure de la PDI

La Protéine Disulfide Isomérase (PDI; EC 5.3.4.1) appartient à la superfamille des thiorédoxines. La PDI est un membre multi-domaines de la superfamille des enzymes thiol-oxydoreductase, elle possède des séquences et une similarité structurale avec la thioredoxine.

Au cours de ces dernières années, plusieurs membres de la famille PDI humaine ont été mis en évidence. Il y a actuellement 19 membres de la famille PDI humaine connus et publiés (Appenzeller-Herzog *et al.*, 2008): PDI, PDIp, Erp18, Erp27 (Alanen *et al.*, 2006), Erp28/29, Erp44, Erp46 (ou EndoPDI), Erp57, Erp72, P5, PDIr, TMX (Thioredoxin-Related Transmembrane Protein), TMX2, TMX3 (Haugstetter *et al.*, 2005), TMX4, Hag2 et Hag3, Erdj5, et PDILT (Ellgaard *et al.*, 2005).

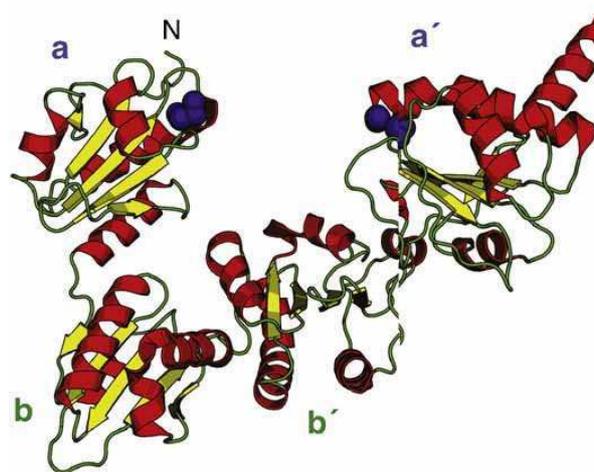
Tous ses membres sont constitués de domaines possédant le même type de repliement : un repliement α/β , avec la structure $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ (Freedman *et al.*, 2002). Le cœur des domaines est constitué de feuillets β de cinq bras, avec tous les bras parallèles (sauf le quatrième bras) entourés par quatre hélices α (Fig. 6).

Fig. 6: Structure tridimensionnelle

de la PDI.

Les hélices α sont représentées en rouge, les feuillets β en jaune et les boucles en vert. Les cystéines des sites actifs (voir paragraphe suivant) sont représentées par des sphères mauves.

D'après **Appenzeller-Herzog et al., 2008**.



La PDI est organisée en 5 domaines structuraux : **a**, **b**, **b'**, **a'**, et **c** (*Fig. 7*). Les domaines **a** et **a'** sont les domaines catalytiques de la PDI. Ils sont homologues à la thiorédoxine et chacun d'eux contient deux cystéines au niveau d'un site actif indépendant CXXC (Appenzeller-Herzog *et al.*, 2008), dont la séquence la plus courante pour les PDIs est Cys – Gly – His – Cys (CGHC) au niveau des résidus 35-38 et 379-382 (Noiva *et al.*, 1999). Certains domaines, pour lesquels une ou même les deux cystéines du site actif sont absentes, sont aussi catalogués en tant que domaines de type **a**, semble-t-il plus par similarité de séquences que par leur activité catalytique (Appenzeller-Herzog *et al.*, 2008). C'est le cas, entre autre, de Hag2, Hag3, Erp44, TMX2. Les domaines **b** et **b'** ne sont pas des domaines catalytiques. Ils sont similaires en séquence l'un par rapport à l'autre mais ne sont pas similaires à la thiorédoxine. Ils ne possèdent pas de cystéines au niveau du site actif et n'ont donc pas de propriétés redox. Le rôle du domaine **b'** est de lier la protéine au substrat. Les domaines **a** et **a'** adoptent un repliement de type thiorédoxine. Malgré le manque de similarité de séquence avec la thiorédoxine, **b** et **b'** adoptent aussi ce repliement. Le domaine **c** est un domaine cationique qui contient le motif KDEL de rétention dans le réticulum endoplasmique C-terminal et qui a une basse affinité pour Ca^{2+} (Hatahet *et al.*, 2007). Il ne semble pas avoir de fonction dans la catalyse de la formation des ponts disulfures natifs par la PDI (Wilkinson *et al.*, 2004 ; Kersteen *et al.*, 2003). Il faut aussi noter l'existence d'une région de 19 acides aminés qui lie les domaine **b'** et **a'** (Hatahet *et al.*, 2007).

Remarque: Le térapeptide KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) est un signal de rétention qui permet de piéger le peptide ou la protéine à laquelle il est attaché dans le réticulum endoplasmique, ce piégeage ayant lieu par interaction à une protéine récepteur de ce motif KDEL décrit par Lewis M.J. *et al.*, 1990 .

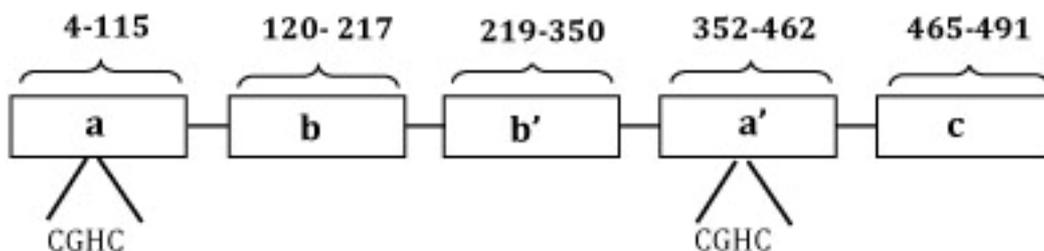


Fig.7: Structure en domaines de la PDI (Suivant Wilkinson *et al.*, 2004)

Malgré leur nom, 5 des 19 membres de la famille PDI humaine (PDILT, ERp27, ERp29, ERp44 et TMX22) ne possèdent pas les deux sites actifs CXXC et donc ne peuvent pas être impliqués dans la formation de ponts disulfures natifs. Cette confusion dans le nom de la famille est apparue du fait que la famille PDI est une sous-famille de la superfamille des thiorédoxines, laquelle est définie par une localisation sous-cellulaire, en étant dans le RE, plutôt que par une fonction (Hatahet *et al.*, 2007).

Le domaine **b'** non catalytique est essentiel et suffisant pour lier des petits peptides (10 à 15 résidus). Dans le cas de peptides plus importants, ou de protéines mal repliées, le domaine **b'** est essentiel mais n'est plus suffisant pour une liaison efficace, indiquant alors que les domaines catalytiques **a** et **a'** contribuent aussi à la liaison (Klappa *et al.*, 1998 ; Hatahet *et al.*, 2007). Ces interactions sont essentiellement de nature hydrophobiques. Vu qu'il y a une interaction entre le domaine **b'** et plusieurs types de peptides différents, Klappa *et al.*, (1998) ont conclu qu'aucun motif de séquence spécifique dans les peptides n'est requis pour la liaison. Par contre, l'interaction entre PDI et le peptide est plus forte si le peptide contient un résidu cystéine, probablement stabilisé par la formation d'un pont disulfure. C'est ce qui a suggéré à Klappa et al. que les domaines impliqués dans les fonctions

enzymatiques de la PDI (par exemple les domaines **a** et **a'**) peuvent aussi contribuer à la liaison des peptides. En effet, les résidus cystéines du domaine **a'** augmentent l'affinité pour la liaison des protéines mal repliées contenant elles-mêmes des résidus cystéines.

L'échange thiol-disulfure peut être catalysé par toute construction contenant soit le domaine **a** soit le domaine **a'**, tandis que l'isomérisation nécessite une combinaison linéaire de ces domaines catalytiques plus le domaine **b'**. Certaines isomérisations complexes qui impliquent des changements conformationnels requièrent toute la protéine à l'exception de la région **c** (Wilkinson *et al.*, 2004 ; Darby *et al.*, 1998). Les domaines **a** et **a'** isolés sont des catalyseurs généralement moins efficaces et fonctionnellement moins flexibles que la PDI intacte (Darby *et al.*, 1998).

Ces observations soulèvent le fait que la haute efficacité catalytique de la PDI puisse être reliée à sa complexité structurelle.

I.c. Rôles de la PDI

La PDI aide au repliement des protéines nouvellement synthétisées (activité chaperonne) et qui catalyse la formation (activité oxydase), la réduction de ponts disulfures (activité réductase) et le réarrangement des ponts disulfures incorrects (activité isomérase) (*Fig. 8*) (Kersteen *et al.*, 2003). Si la PDI n'accélérait pas la formation des ponts disulfures natifs, la formation de ces ponts de façon non catalysée prendrait plusieurs jours, même dans les conditions de tampon redox physiologique. La PDI doit être oxydée pour être active dans la formation de ponts disulfures, et réduite pour agir sur les protéines mal conformées.

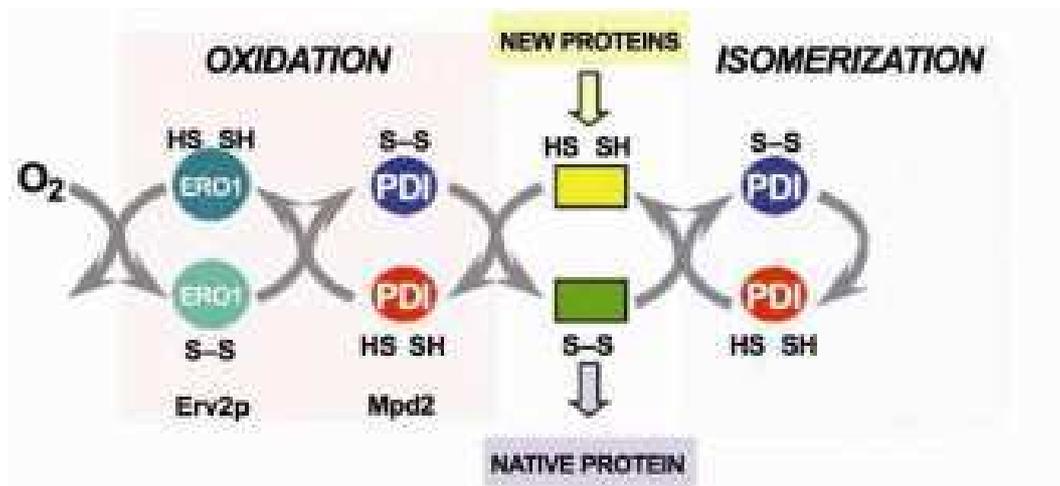


Fig.8: Activités de la PDI (Wilkinson *et al.*, 2004)

En dehors de son activité catalytique, la PDI montre aussi son activité chaperonne par l'inhibition de l'agrégation des protéines non repliées (Cai *et al.*, 1994) ou qui ne contiennent pas de résidus cystéines (Winter *et al.*, 2002). En effet, l'activité catalytique du repliement des protéines accélère les étapes plus lentes des mécanismes de repliement tandis que l'effet des chaperonnes moléculaires est d'inhiber les étapes non-productives des mécanismes de repliement. Par exemple, elles retardent l'initiation du repliement jusqu'à ce que les séquences appropriées aient été traduites. En fait pour faciliter le repliement des protéines, la PDI agit à la fois comme une oxydoréductase et comme une chaperonne.

Bien que la PDI montre des activités isomérase et chaperonne, la protéine semble plus efficace comme isomérase que comme chaperonne (Hatahet *et al.*, 2007 ; Mayer *et al.*, 2000 ; Lilie *et al.*, 1994)

La PDI se voit aussi avoir un rôle dans l'inflammation. En effet, il semble s'avérer que son inhibition promeuve la production de cytokine pro-inflammatoires (Higuchi *et al.*, 2004).

I.c.1. Activité oxydoréductase

L'oxydation des protéines catalysée par la PDI mène à la formation de ponts disulfures. Durant cette réaction, la PDI gagne deux électrons, et pour ce faire, elle doit être sous forme oxydée (pont disulfure au sein de la PDI). Cette réaction mène à

l'oxydation de deux cystéines de la protéine et à la réduction du site actif de la PDI (Jessop *et al.*, 2004(a)).

Une fois la réaction d'oxydation terminée, la PDI est régénérée sous sa forme oxydée par la protéine ERO1 (endoplasmic reticulum oxydoreductase) (Jessop *et al.*, 2004(b)). Il existe deux types de ERO1 : ERO1 α et ERO1 β . ERO1 catalyse sélectivement la ré-oxydation de PDI, par le couplage de l'introduction d'un pont disulfure dans la PDI avec la réduction d'un oxygène moléculaire O₂ (Sevier *et al.*, 2008). Mais son activité mène à la formation d'H₂O₂. ERO1 est donc une source d'espèces activées de l'oxygène (ROS) (Baker *et al.*, 2008, Tu *et al.*, 2004).

La réduction des protéines catalysée par la PDI mène à la rupture des ponts disulfures de la protéine. Pour pouvoir agir, les sites actifs de la PDI doivent se trouver sous leur forme réduite pour pouvoir donner deux électrons au substrat. PDI dans son état réduit permet donc la formation de ponts disulfures corrects.

La réaction qui sera catalysée par la PDI (oxydation ou réduction) dépend de la position de l'équilibre de la réaction et de l'état redox du site actif de la PDI (Papp *et al.*, 2006).

Après l'oxydation d'une protéine naissante, PDI se trouve donc dans un état réduit. Si le pont disulfure formé n'est pas dans son état natif, la PDI réduite peut immédiatement lier le substrat et modifier le pont par isomérisation (Sitia *et al.*, 2004).

Le ratio GSH/GSSG dans le RE rend celui-ci plutôt oxydant. En effet, on compte GSH/GSSG=3/1 dans le RE en comparaison de GSH/GSSG =100/1 dans le cytoplasme (Tu *et al.*, 2004 ; Townsend, 2007). On peut donc considérer le RE comme un environnement plus oxydant, condition cruciale pour la formation de ponts disulfures (Silta *et al.*, 2004).

D'un point de vue structurel de la PDI, un des sites actifs CGHC de la PDI se trouve près de l'extrémité *N*-terminale (domaine **a**) et l'autre site actif près de l'extrémité *C*-terminale (domaine **a'**) (*Fig. 6, sphères mauves*). Les deux cystéines de ces sites actifs peuvent former des liens disulfures intramoléculaires (forme oxydée

de la PDI) ou exister sous la forme de dithiol (forme réduite de la PDI). La constante d'équilibre de cette réaction est approximativement de 1mM (Wilkinson *et al.*, 2004), faisant de la PDI un bon oxydant cellulaire en comparaison aux autres membres de la famille thiorédoxine (Huber-Wunderlich *et al.*, 1998).

Pour pouvoir être effective du point de vue de son activité oxydoréductase, seul les domaines **a** ou **a'** de la PDI sont nécessaires.

I.c.2. Activité isomérase

La formation de ponts disulfures qui apparaît très tôt durant le repliement des protéines est souvent sujette à des erreurs, ce qui entraîne la liaison de deux cystéines d'une manière incorrecte vis-à-vis de la structure naturelle, ou entraîne la liaison correcte de cystéines mais dans un ordre qui empêche les repliements ultérieurs de la protéine.

L'isomérisation des ponts disulfures mal formés dans les protéines est catalysée par la PDI sous sa forme réduite. Cette réaction consiste en la réorganisation des ponts disulfures mal formés. Dans ce cas, aucun échange d'électron n'a lieu (Jessop *et al.*, 2004(a)) (*Fig. 9*).

Le mécanisme de l'isomérisation est le suivant :

Un pont disulfure non natif subit l'attaque nucléophile d'un thiolate de la PDI. Il en résulte un complexe substrat-PDI, lié de manière covalente. Ce dernier contient un groupement thiolate qui peut réaliser des échanges intramoléculaires thiol – disulfure pour former le pont disulfure natif. Le second thiol du site actif de la PDI peut fournir une réaction parallèle si les échanges intramoléculaires sont trop lents.

La reconnaissance des protéines qui possèdent un bon repliement, résulte du fait qu'à l'inverse des protéines mal repliées elles constituent de mauvais substrats de la PDI qui dès lors ne peut les prendre en charge, même quand les conditions redox de la cellule sont en faveur de la réduction du substrat.

Fonctionnellement, l'isomérisation nécessite les domaines **a** ou **a'** en combinaison avec le domaine **b'**. Les réactions d'isomérisation complexes qui

impliquent des changements conformationnels requièrent tous les domaines de la PDI, à l'exception du domaine **c** (Wilkinson *et al.*, 2004).

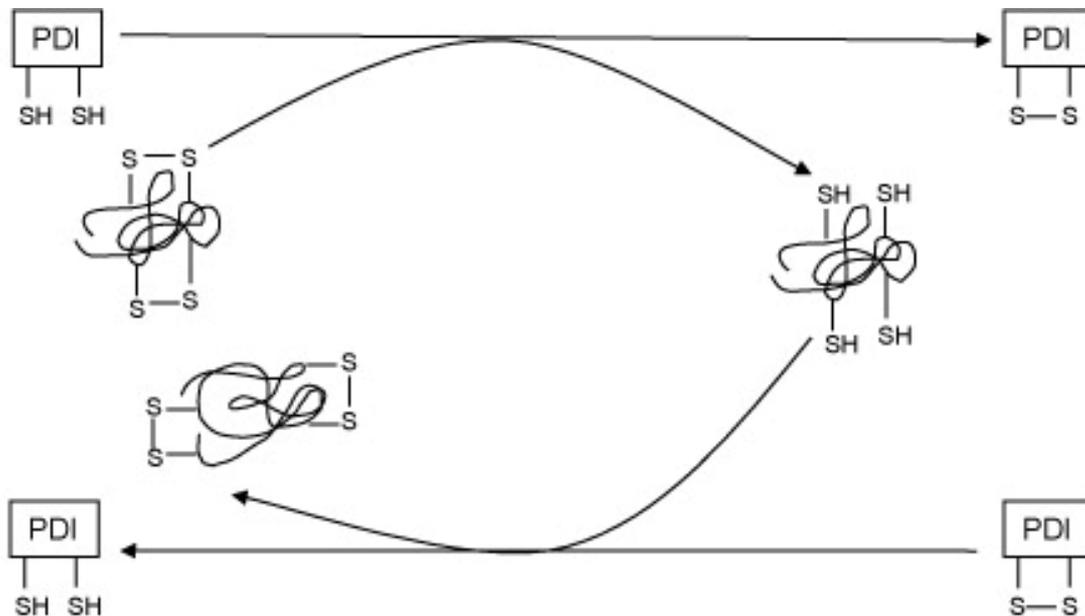


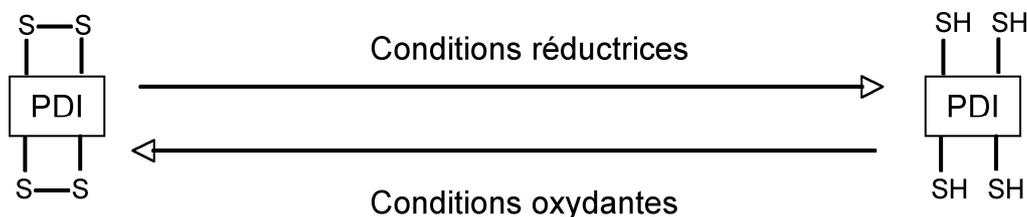
Fig. 9 : Activité isomérase de la PDI

I.c.3. Activité chaperonne

La PDI facilite le repliement des protéines en agissant comme une chaperonne moléculaire. Elle manifeste cette activité chaperonne durant la maturation des protéines en empêchant l'agrégation des protéines mal ou non repliées, certaines ne contenant pas de ponts disulfures. Pour cela, elle se lie aux chaînes mal ou non repliées. A des concentrations stoechiométriques, PDI facilite le repliement du glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GADPH) (Cai *et al.*, 1994) ainsi que de la rhodanese (Song *et al.*, 1995), alors qu'aucun des deux ne possèdent de ponts disulfures. Cela confirme donc l'activité chaperonne de la PDI.

L'activité chaperonne de la PDI protège spécifiquement les protéines et les cellules des effets délétères des ROS. La PDI est sous le contrôle du stress oxydant : la protéine « sent » les changements des conditions redox de

l'environnement et traduit ces changements par des modifications de conformation de la PDI en fonction des conditions oxydante ou réductrice du milieu. En effet, la PDI sous forme oxydée ou réduite a des conformations différentes (Papp *et al.*, 2006).



Ces modifications de conformation augmentent ou diminuent l'affinité de liaison à la protéine substrat. Cette régulation de la PDI se fait au niveau des deux sites actifs des cystéines par des liens disulfures réversibles.

La suppression des 51 acides aminés C-terminaux de la PDI mène à une perte de l'activité chaperonne, suggérant que le site de liaison peptidique localisé à l'interface des domaines **a'** et **c** est essentiel pour l'activité chaperonne (Noiva, 1999).

I.c.4. Activité anti-chaperonne

Dans ce cas, la PDI facilite l'agrégation et inhibe le repliement correct. La PDI participe directement à la formation d'agrégats insolubles entre elle-même et les polypeptides non repliés. La participation de la PDI à cette agrégation peut être une partie d'un phénomène physiologique important. Quand la capacité de repliement de la cellule est perturbée, comme durant une surexpression protéique, une déplétion d'ATP ou un déséquilibre redox, les protéines sont retenues dans le réticulum endoplasmique sous la forme d'agrégats réduits ou liés par ponts disulfures. Les agrégats et les protéines mal repliées sont souvent associés avec la PDI. A la restauration des taux d'ATP ou de l'équilibre redox, les agrégats du réticulum endoplasmique peuvent être correctement repliés. L'activité anti-chaperonne de la PDI retiendrait donc les protéines mal ou non repliées dans le réticulum

endoplasmique jusqu'à ce que les conditions physiologiques normales soient restaurées (Noiva, 1999 ; Sideraki *et al.*, 2000).

Le terme « anti-chaperonne » semble être un terme approprié à cette activité car la fonction normale d'une chaperonne est de limiter l'agrégation des polypeptides non repliés, et nous sommes ici en présence d'une fonction totalement inversée. L'activité anti-chaperonne de PDI sert d'outil de contrôle qualité en fournissant un mécanisme efficace pour retenir les protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique (Puig *et al.*, 1994).

L'action de la PDI comme chaperonne ou anti-chaperonne dépend du rapport entre la quantité de protéines non repliées et la concentration de la PDI. *In vitro*, quand la quantité de polypeptides non repliés est en vaste excès par rapport aux concentrations de la PDI, la PDI agit comme une anti-chaperonne. De plus, l'activité anti-chaperonne requiert des conditions réductrices *in vitro* (Noiva, 1999). Les sites dithiols/disulfides de la PDI sont essentiels pour l'activité chaperonne observée à des hautes concentrations de la PDI, mais ils ne sont pas requis pour l'activité anti-chaperonne remarquée à de basses concentrations de la PDI (Puig *et al.*, 1994, Sideraki *et al.*, 2000).

II. Induction de la PDI : L'alcool 4-hydroxybenzylique

L'alcool 4-hydroxybenzylique (4-HBA) est reconnu pour être un inducteur de la PDI (Yu *et al.*, 2005). Il est intéressant de voir si induire la PDI pourrait apporter un effet neuroprotecteur dans le cadre de l'ischémie reperfusion cérébrale.

II.a. Origine du 4-HBA

L'alcool 4-hydroxybenzylique (4-HBA) ou l'alcool para-hydroxybenzylique est l'un des principes actifs d'une plante médicinale asiatique de type orchidée, la *Gastrodia elata* Blume (GeB) appelée aussi Tian Ma en chinois et dont la traduction littérale est « chanvre céleste ».

Cette plante est surtout retrouvée en Asie de l'est, et spécifiquement dans les chaînes montagneuses de la Chine et de la Corée. L'orchidée pousse en relation étroite et complexe avec deux champignons : le *Mycena osmundicola*, qui fournit les nutriments aux graines durant la germination, et l'*Armillaria mellea* (dont le nom chinois est mihuanjuan) qui envahit les tubercules germés et fournit nutriments et énergie. L'absence de ces champignons prévient la germination et la croissance de l'orchidée *Gastrodia* (Xu *et al.*, 2000). Le rhizome de la GeB est utilisé dans les pays orientaux depuis des siècles, il est d'ailleurs officiellement repris dans pharmacopée chinoise (Chinese Pharmacopoeia).

II.b. Synthèse chimique du 4-HBA

Même si 4-HBA est généralement extrait du GeB, il est intéressant de noter que cette molécule peut être synthétisée chimiquement à partir du phénol et du formaldéhyde par une réaction d'hydroxyméthylation (Hsieh *et al.*, 1998).

En effet, la réaction entre un phénol et un formaldéhyde en milieu alcalin permet l'introduction d'un groupe hydroxyméthyle dans le noyau aromatique aux positions *ortho* ou *para* (ou les deux) du groupe hydroxyle. Les deux isomères *ortho* et *para* sont produits par réaction simultanée à partir de l'anion phénolate.

La réaction d'un phénol avec le formaldéhyde correspond à une substitution aromatique électrophile. Le phénol est présent sous forme d'anion phénolate, pour lequel la charge négative est stabilisée par résonance (délocalisation électronique)

aux positions *ortho* et *para* (Fig. 10). La réaction avec la charge positive partielle sur le carbone du formaldéhyde peut alors avoir lieu aux positions *ortho* et *para*.

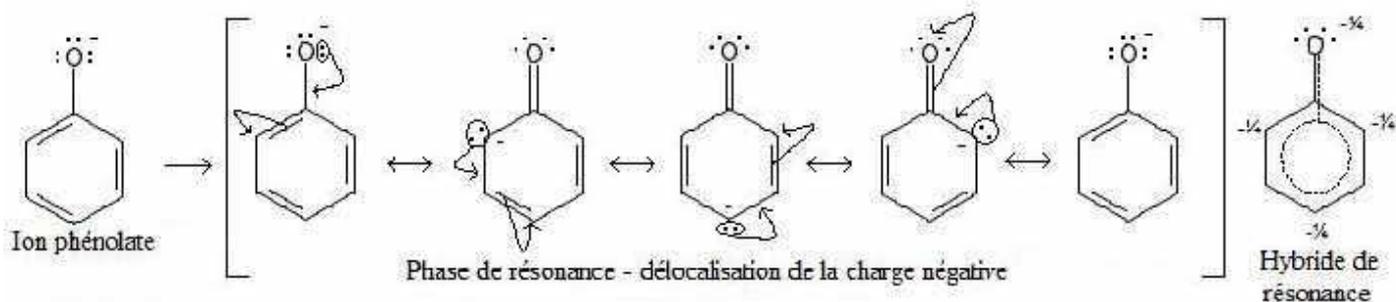


Fig. 10 : Délocalisation électronique du phénol

La méthode conventionnelle de préparation des phénols hydroxyméthylés, en milieu alcalin, donne un mélange des isomères *ortho* et *para* (Fig. 11). On obtient une tautomérisation dont l'équilibre est en faveur de la forme phénol qui est la plus stable en raison de son caractère aromatique.

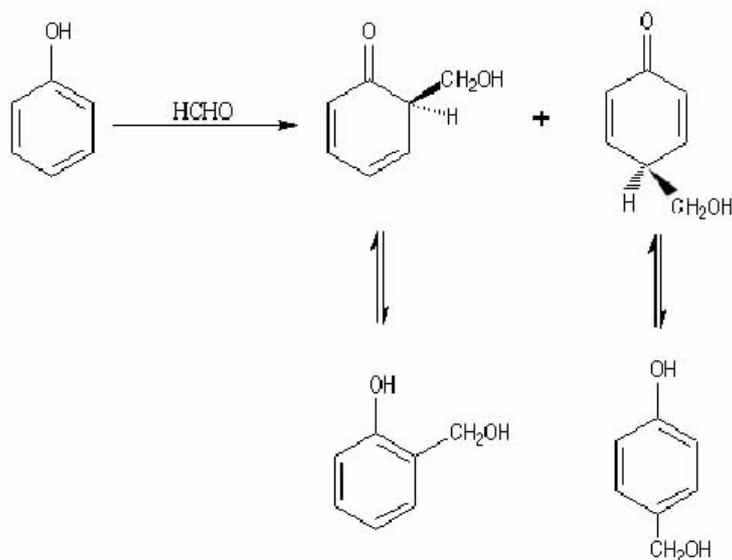


Fig. 11 : Synthèse des phénols hydroxyméthylés

Comme la séparation de ces isomères n'est pas aisée, de nombreux sels de métaux divalents sont utilisés pour une synthèse sélective de l'un de ces isomères. Les cyclodextrines et leurs dérivés, par exemple, sont employés comme catalyseurs pour la production sélective de l'isomère *para* (Selvam *et al.*, 2003).

II.c. Utilisation de 4-HBA

Le composé actif principal isolé de la GeB a été appelé la gastrodine. Il s'agit d'un glycoside composé d'un glucose et d'une molécule d'alcool 4-hydroxybenzylique. En plus d'une administration orale, la gastrodine a déjà été utilisée par voie intraveineuse et intramusculaire dans des essais cliniques en Chine (Ojemann *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). Bien que la gastrodine soit l'un des composés actifs principaux tenu pour responsable des effets cliniques de la GeB, différentes études ont suggéré que les effets pharmacologiques ne puissent pas être expliqués par le seul fait de la gastrodine (Junhua *et al.*, 1989). En conséquence, d'autres composés actifs que la gastrodine sont contenus dans la GeB.

Des études phytochimiques ont révélé la présence de plusieurs composés phénoliques (*Fig. 12*) dans la GeB, dont le 4-HBA, qui nous intéresse ici (Choi *et al.*, 2006). Les autres composés mis en évidence sont le 4 hydroxybenzaldéhyde, la vanilline et l'alcool vanillique (Hayashi *et al.*, 2002).

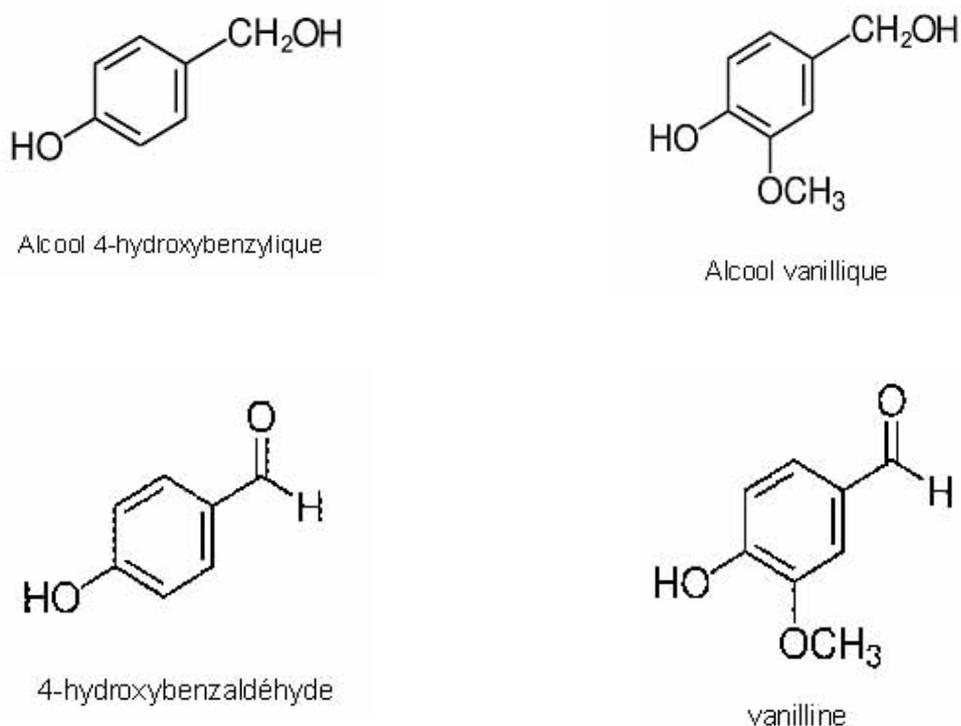


Fig. 12 : Certains des différents composés phénoliques présents dans la GeB

Le 4-HBA a fait l'objet de nombreuses études dans différents domaines pathologiques. On peut donc remarquer les fonctions de 4-HBA suivantes :

Cette molécule montre un effet significatif dans le piégeage des radicaux libres et de la réduction des niveaux de peroxydation lipidique (Liu and Mori, 1992, 1993 ; Hsieh *et al.*, 2001).

Les composés trouvés dans la GeB, dont le 4-HBA, inhibent l'apoptose induite par le glutamate dans les cellules neuronales (Lee *et al.*, 1999) et possèdent une activité anti-inflammatoire (Lee *et al.*, 2006 ; Lim *et al.*, 2007).

De plus, 4-HBA se montre efficace dans le traitement de l'épilepsie (Hsieh *et al.*, 2001) et possède une activité anti-convulsivante (Ojemann *et al.*, 2006 ; Hsieh *et al.*, 1999). Ha et ses collaborateurs ont, de leur côté, montré que le 4-hydroxybenzaldéhyde, un analogue de 4-HBA, contribue à une activité antiépileptique et anti-convulsivante par un mécanisme antioxydant ainsi qu'une neuromodulation positive du système GABAergique (Ha *et al.*, 2000).

Parmi les autres effets de 4-HBA, nous pouvons noter :

Un effet analgésique et sédatif (Huang *et al.*, 2007), des effets contre le vertige (Huang *et al.*, 2007), l'hypertension, la paralysie générale, le tétanos (Hyeon-Ju *et al.*, 2003), et le mal de tête (Huang *et al.*, 2007). 4-HBA a de plus montré des propriétés anti-angiogéniques et anti-nociceptive (nociception = perception des stimulations produisant la douleur) grâce à une possible activité visant à diminuer la production de NO (Lim *et al.*, 2007).

On note aussi une amélioration des processus d'apprentissage et de mémorisation après une administration aiguë de 4-HBA, attribuable à la diminution de la concentration cérébrale en dopamine ainsi qu'à une diminution de la dégradation de l'ADN (Hsieh *et al.*, 1997).

Une étude menée par Jung a montré que le 4-HBA ainsi que le 4-hydroxybenzaldéhyde possèdent des propriétés anxiolytiques. Il suggère que ces

effets anxiolytiques doivent impliquer les systèmes nerveux GABAergiques et sérotoninergiques (Jung *et al.*, 2006).

Une application pour le moins inattendue du 4-HBA est son rôle comme agent de blanchiment de la peau en cosmétique. En effet, une étude publiée en 2007 montre que le 4-HBA posséderait un effet inhibiteur sur l'activité tyrosinase et sur la mélanogenèse (Liu *et al.*, 2007). Les inhibiteurs de tyrosinase sont, ainsi que les répresseurs du métabolisme et de la prolifération des mélanocytes, les produits les plus utilisés dans les traitements de la pigmentation.

II.d.Neuroprotection

Plusieurs études rapportent l'utilisation du 4-HBA comme agent d'induction de la PDI dans l'ischémie cérébrale, mais le mécanisme d'induction n'a pas encore été déterminé.

Une étude a été menée pour déterminer l'effet du 4-HBA sur les lésions cérébrales post-ischémiques ainsi que sur les niveaux de la PDI déjà connue pour influencer les systèmes antioxydants après une ischémie cérébrale chez le rat (Yu *et al.*, 2005). Dans cette étude, les animaux étaient traités en préconditionnement par 4-HBA trois jours avant l'induction de l'IRC (ischémie d'une heure suivie de 24h de reperfusion). Une analyse histopathologique a révélé chez les animaux traités avec le 4-HBA une diminution significative de la taille d'infarctus cérébral du côté ipsilatéral à l'occlusion vasculaire. De plus dans ce groupe, les niveaux de la PDI étaient augmentés par rapport à ceux mesurés dans les groupes non traités. Cette étude a ainsi montré que le 4-HBA augmentait le taux cellulaire de protéines antioxydantes et ce faisant induisait une neuroprotection en prévenant l'étendue des lésions ischémiques.

Kim *et al.* (2007) de leur côté avaient mis en évidence que le 4-HBA, ainsi que la vanilline et l'aldéhyde 4-hydroxybenzylique prévenaient la mort des cellules hippocampales CA1 qui suivait une ischémie globale. Les animaux (gerbilles) traités pré- et post- attaque ischémique par le 4-HBA, ainsi que par la vanilline et l'aldéhyde 4-hydroxybenzylique, montraient une augmentation significative de la survie neuronale (66, 32%, 43,21 % et 64,58% respectivement pour les animaux traités au

4-HBA, à la vanilline et à l'aldéhyde 4-hydroxybenzylique) en comparaison aux animaux traités avec le véhicule. De plus, ils suggéraient que 4-HBA inhibe le stress oxydant et l'excitotoxicité pour au moins 12h.

II.e. Toxicité du 4-HBA

Peu d'études concernent la toxicité du 4-HBA. A notre connaissance, aucune étude générale sur la toxicité du 4-HBA dans le cadre de l'ischémie n'est parue.

Dans une étude réalisée par Riley et ses collaborateurs en 1997, la toxicité de différents phénols avait été réalisée en comparant leur taux d'oxydation par une tyrosinase du champignon *in vitro* par oxymétrie et spectrophotométrie, ainsi que pour leur action cytotoxique. La toxicité était exprimée en comparaison du 4-hydroxyanisole ($IC_{50} = 11.7 \mu M$). Dans le cas du 4-HBA, ils obtenaient une valeur de 0.36 pour l'index de cytotoxicité comparatif, ce qui donne un IC_{50} de $4,212 \mu M$. Lors de leur étude, ils ont comparé la cytotoxicité avec le taux d'oxydation et ces données suggèrent que l'action cytotoxique majeure est due à la déplétion en thiols et que l'accès aux sites intracellulaires est nécessaire pour que l'action cytotoxique soit provoquée (Riley *et al.*, 1997).

Une autre étude réalisée sur les larves de poissons étoiles (flagfish) *Jordanella Floridae* a déterminé la concentration de différents phénols para-substitués responsable de 20% de mortalité après 94h. Les larves étaient exposées durant deux heures au phénol, et le taux de mortalité était déterminé au bout de 94h. Les résultats ont montré que cette concentration est de 6.4mg/l pour le 4-HBA, ce qui correspondait à une des molécules les moins toxiques, juste après l'acide hydroxybenzoïque (170mg/l) (Holdway *et al.*, 1991).

Une troisième étude réalisée sur des coupes de foie de rat indiquait que dans ce contexte, le 4-HBA n'était pas toxique à une concentration de 2mM (Thompson *et al.*, 1994).

III. Inhibition de la PDI : la bacitracine

La bacitracine est un antibiotique dont le mode d'action par l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne importante pour la fonction vitale de la bactérie est bien connu (Storm, 1974 ; Ming, 2003). En dehors de son effet sur la paroi des bactéries, la bacitracine est connue pour ses fonctions inhibitrices de la PDI.

III.a. Structure

La bacitracine est un antibiotique dodécapeptide métallo-dépendant (*Fig. 13*) excrété par les espèces de *Bacillus*, incluant *B. Subtilis* et *B. Licheniformis*. Il s'agit d'un antibiotique possédant un spectre limité dirigé de façon primaire contre les bactéries Gram positives, comme le *Staphylocoque* et le *Streptocoque*, via l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire.

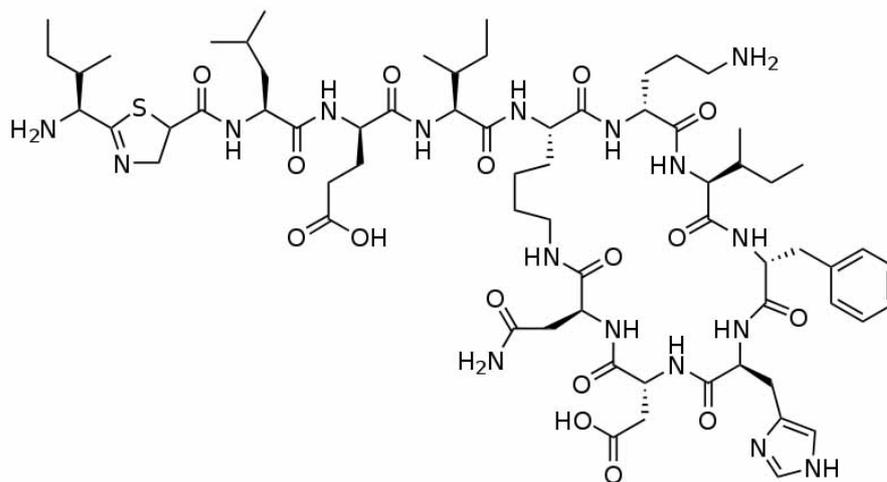


Fig. 13: Structure de la bacitracine

III.b. Inhibition de la PDI

La bacitracine possède la propriété d'inhiber les fonctions réductrice et oxydante de la PDI (Mizunaga *et al.*, 1990 ; Ryser *et al.*, 1994, Clive *et al.*, 1994) ainsi que de l'isomérase à travers des interactions composé/protéine. (O'Neill *et al.*, 2000). La bacitracine n'est pas un inhibiteur fort de l'activité enzymatique de la PDI, mais est le seul candidat inhibiteur pour réduire l'activité de PDI dans un système de

culture cellulaire (Higuchi *et al.*, 2004). Cependant, le mécanisme par lequel la bacitracine affecte la PDI n'est pas clair (Weston *et al.*, 2001)

III.c. Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries

La bacitracine est un bactéricide envers une grande variété d'organismes Gram-positifs. Les bactéries gram ont typiquement une fine paroi cellulaire composée d'un unique polysaccharide appelé peptidoglycane qui n'est pas présent dans les cellules eucaryotes (Ming *et al.*, 2002). Par conséquent, l'inhibition de la biosynthèse de la couche de peptidoglycane affecte seulement la paroi cellulaire bactérienne et non celles des cellules animales. La bacitracine bloque la synthèse de cette paroi cellulaire en inhibant la régénération des récepteurs phospholipides impliqués dans la synthèse du peptidoglycane (Ryser *et al.*, 1994). L'interaction de la bacitracine avec la membrane cellulaire peut avoir un profond effet sur celle-ci et fortement changer la morphologie, la structure et la perméabilité des membranes cellulaires (Hancock *et al.*, 1964 ; MacDonald *et al.*, 1974).

Médicalement, la bacitracine est utilisée comme une des composantes, avec la néomycine et la polymyxine B, dans plusieurs pommades locales médicinales humaines alliant trois antibiotiques («triple antibiotiques») disponibles commercialement (Blas *et al.*, 2000 ; Savitz *et al.*, 1998 ; Lin *et al.*, 1998 ; Dyck *et al.*, 1997).

III.d. Toxicité

La bacitracine est néphrotoxique; elle n'est donc pas administrée systématiquement et est utilisée seulement en dernier recours. Par contre, elle est considérée comme sûre en prise orale, du fait que le système gastro-intestinal n'absorbe pas de quantités

3^{ème} PARTIE : PDI et IRC

Vu le manque évident de solution thérapeutique disponible pour faire face aux accidents vasculaires cérébraux, l'étude NEURONOX a tenté de mettre en évidence de nouvelles cibles pharmacologiques dans le cadre de l'IRC. Ce projet s'orientait sur la modulation pharmacologique des marqueurs de stress oxydant au cours du processus de mort neuronale (article en cours de préparation).

La PDI avait alors été mise en évidence au cours d'une étude protéomique réalisée dans le but de comparer les différents niveaux protéiques en fonction des conditions normales ou ischémiques chez la souris. Cette protéine a été surexprimée (Fig. 14, flèches rouges) lors du passage des conditions saines (non ischémiques) aux conditions ischémiques.

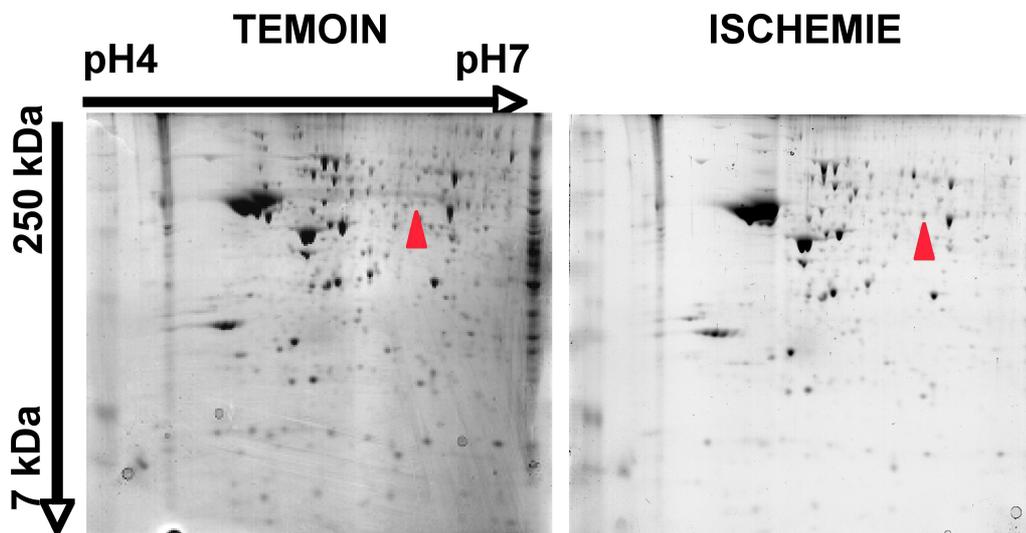


Fig.14 : Gels de Western Blot montrant les différences dans les niveaux protéiques entre les conditions saines (témoins) et ischémiques

En 2000, Tanaka et al. avaient déjà mis en évidence une induction de la PDI lors de l'ischémie. Ils avaient tout d'abord mis en évidence cette induction *in vitro*, en réponse à un contexte hypoxique (2% O₂, 48h) suivie d'une ré-oxygénation (20% O₂, ~48h) sur une culture primaire d'astrocytes provenant du rat. Ils avaient ensuite montré cette induction de PDI *in vivo* au niveau du cortex du rat lors d'une ischémie transitoire du cerveau antérieur en utilisant le modèle expérimental dit des quatre vaisseaux (4VO). Dans leur étude, aucune induction de la PDI n'était observée au

niveau de l'hippocampe, ni du striatum. Ils ont de plus étudié le rôle de la surexpression de PDI dans la mort neuronale induite par hypoxie sur un type de cellules du neuroblastome (tumeur solide extra-crânienne) humain. Il s'est avéré que la surexpression de PDI avait un rôle neuroprotecteur contre l'hypoxie dans les neurones. Malgré tout, les mécanismes de la neuroprotection induite par l'augmentation de la PDI ne sont pas connus.

Influencer l'induction et l'inhibition de la PDI permettra la mise en évidence du rôle de cette protéine dans l'ischémie reperfusion cérébrale et apportera des pistes quant aux mécanismes d'action de l'induction de la PDI dans la neuroprotection

Le 4-HBA a été utilisé précédemment par Yu et al. (2005) pour induire la PDI. Le 4-HBA, utilisé dans un contexte de préconditionnement, apportait une protection cérébrale en prévenant des lésions cérébrales, par une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines antioxydantes, dont la PDI, après une ischémie cérébrale focale et pouvait donc être efficace comme agent neuroprotecteur à des niveaux cellulaires et moléculaires dans le cerveau.

Différentes études rapportent que la bacitracine, un antibiotique bien connu, aurait la capacité d'inhiber l'activité de la PDI (Higuchi *et al.*, 2004 ; Clive *et al.*, 1994 ; Ryser *et al.*, 1994 ; Mizunaga *et al.*, 1990).

La PDI a donc été considérée comme protéine d'intérêt en vue de la recherche de nouvelles cibles pharmacologiques au cours de l'IRC dans ce travail.

PRESENTATION DU TRAVAIL

Le développement de nouvelles approches pharmacologiques pour le traitement de l'ischémie cérébrale nécessite de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques cellulaires et moléculaires mis en jeu dans l'IRC. Le stress oxydant, lié à la libération excessive de radicaux libres, constitue une des voies physiopathologiques conduisant à la mort neuronale dans de telles pathologies.

Lors de l'ischémie cérébrale, le niveau de la PDI est augmenté, ce qui a été mis en évidence par analyse protéomique dans le projet Neuronox visant à mettre en évidence les marqueurs du stress oxydant et confirmant ainsi la littérature (Tanaka *et al.*, 2000). Au niveau du RE, la PDI développe son activité enzymatique oxydoréductase et isomérase lors du repliement des protéines par la formation de ponts disulfures, mais est aussi impliquée de par son activité chaperonne dans la protection des protéines et des cellules face aux effets délétères des ROS

Par différentes approches, nous espérons mieux comprendre l'implication de la PDI lors de l'ischémie reperfusion cérébrale et ainsi lors des mécanismes cellulaires sous-jacents au stress oxydant induit par l'ischémie.

Dans une première partie, pour étudier si la protection cérébrale pouvait être PDI-dépendante, nous avons traité des souris ayant subi des IRC par le 4-HBA, un inducteur de la PDI et/ou la bacitracine, un inhibiteur de la PDI. Dans ce modèle d'IRC, la mesure de la taille d'infarctus nous a permis de déterminer le caractère neuroprotecteur de la stimulation de la PDI. Par Western Blot nous avons déterminé si cette neuroprotection pouvait être relié à l'induction de la PDI.

Une seconde partie du travail a été destinée à l'évaluation des molécules isomères de position ou analogues linéaires du 4-HBA, suivant les mêmes critères que dans la première partie. Ces évaluations tendaient à déterminer les pré-requis structuraux à l'induction de la PDI par le 4-HBA et, par là, de peut-être obtenir une meilleure neuroprotection dans l'IRC, via l'induction de la PDI

Ces différentes parties ont fait l'objet d'une publication montrant que la neuroprotection induite par le 4-HBA dans l'ischémie cérébrale est supprimée par la bacitracine.

La troisième partie du travail porte sur l'étude du 4-HBA dans un second modèle d'évaluation de la neuroprotection des molécules : le modèle de crises audiogènes dépendante en magnésium. Ce test nous permettait d'évaluer le potentiel neuroprotecteur de 4-HBA dans des conditions cérébrales lésionnelles autres que celles de l'IRC.

L'ensemble de ces résultats m'amènera à discuter des liens entre l'activation de la PDI, les mécanismes cellulaires impliqués dans le stress oxydant et la neuroprotection dans l'IRC. Le rôle potentiel de l'action protectrice de la PDI dans les maladies neurodégénératives d'Alzheimer et Parkinson sera objet de ma conclusion.

MATERIEL ET METHODES

I. Animaux

Les animaux utilisés lors de ce travail sont des souris C57 Black de 28-30g (Janvier, Le Genest Saint Isle, France), en respect des conditions expérimentales du modèle d'ischémie reperfusion cérébrale. Les animaux ont été hébergés dans un environnement contrôlé à 20°C avec alternance jour- nuit de 12 heures et libre accès à l'eau de boisson et à la nourriture.

II. Substances chimiques utilisées

4-HBA (indiqué comme inducteur de la PDI par Yu *et al.*, 2005), ainsi que ses isomères de position 3-HBA (alcool 3-hydroxybenzylique) et 2-HBA (alcool 2-hydroxybenzylique), ses analogues linéaires butanediol (BD) et pentanediol (PD), et la bacitracine (connue comme inhibiteur de la PDI) étaient achetés auprès de Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). L'anticorps monoclonal de souris anti PDI (SPA-891) était acheté auprès de Assay Designs (Ann Arbor MI, USA).

III. Composés dérivés du 4-HBA évalués

Pour pouvoir obtenir le meilleur effet de neuroprotection possible dans le cadre de l'ischémie cérébrale mais aussi dans le but de déterminer les caractéristiques structurales nécessaire dans le cadre d'une neuroprotection, l'étude d'autres molécules a été envisagée.

Le choix de ces molécules s'est porté sur plusieurs composés, en fonction de différents critères :

- la position du groupement hydroxyle
- Importance du cycle aromatique
- Etude comparative des protections offertes par l'alcool 4-hydroxybenzylique et la 6-hydroxyflavanone

III.a. Rôle de la position du groupement hydroxyle sur le cycle aromatique

Essai de l'alcool 2-hydroxybenzylique (2-HBA) et de l'alcool 3-hydroxybenzylique (3-HBA) en comparaison au 4-HBA en vue de déterminer

l'importance de la position du groupement hydroxyle sur le cycle aromatique, et par là, l'importance de l'effet de délocalisation électronique (effet de résonnance) dans l'effet protecteur observé pour 4-HBA.

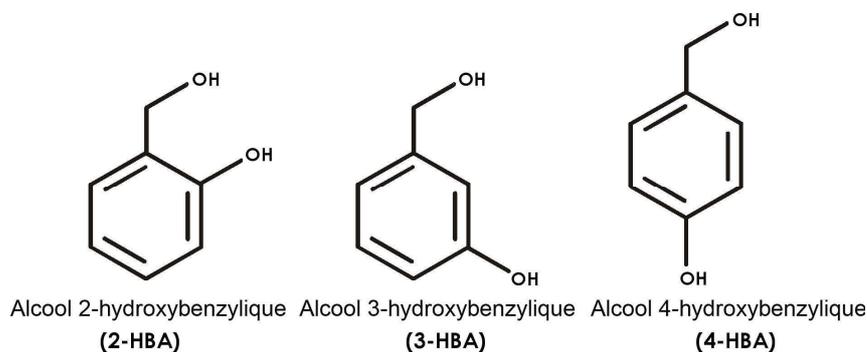


Fig. 15 : Formules chimiques des isomères de position du 4-HBA

III.b. Rôle du cycle aromatique : évaluation des analogues linéaires du 4-HBA

Essai du 1,4-butanediol (BD) et du 1,5-pentanediol (PD) en vue de déterminer l'importance du cycle aromatique dans l'effet protecteur observé pour 4-HBA. En effet, nous pouvons comparer le BD à l'analogue linéaire du 3-HBA et le PD à l'analogue linéaire du 4-HBA. Nous n'avons pas évalué l'analogue linéaire du 2-HBA, qui aurait été le 1,3-propanediol,

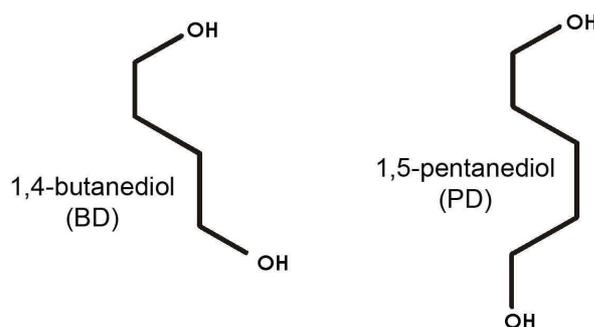


Fig. 16 : Formules chimiques des analogues linéaires du 4-HBA

IV. Anesthésie

La nature de la médication anesthésique utilisée a son importance car certains agents anesthésiques possèdent un potentiel neuroprotecteur pouvant interférer avec celui mesuré. Dans notre étude, les animaux ont été anesthésiés par l'injection intra-péritonéale (i.p.) d'hydrate de chloral (300 mg/kg) dépourvue d'effet neuroprotecteur substantiel.

V. Ischémie reperfusion cérébrale : modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO)

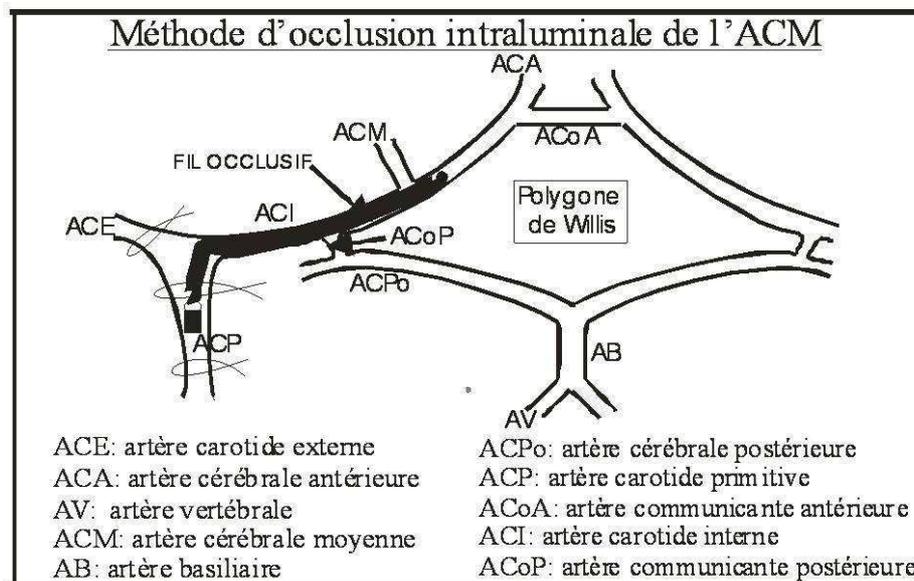


Fig 17. : Méthode d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne

Cette opération se réalise à l'aide d'un microscope chirurgical (Wild M650, Wild Heerbrugg ou Leica M651). Dès que l'animal est anesthésié, il est ouvert au niveau de la région cervicale à l'aide d'un scalpel. Les deux glandes salivaires sont séparées, puis l'artère carotide primitive, externe et la ptérygopalatine sont dégagées. La ligature de l'artère carotide externe et de l'extrémité basse de l'artère carotide primitive sont effectuées. Un nœud provisoire est posé sur la carotide primitive au dessus du premier nœud. Puis un clamp est installé à la bifurcation de la carotide interne et de la carotide externe. Une incision est effectuée au niveau de la carotide primitive grâce aux micro-ciseaux pour introduire un fil de nylon chirurgical (Ethicon 6/0) dont l'embout est arrondi à la flamme. Le nœud provisoire est serré et

le clamp retiré afin de monter le fil chirurgical jusqu'à l'artère cérébrale moyenne. L'ostium de l'artère cérébrale moyenne est donc obstruée : l'ischémie est ainsi provoquée (*Fig. 17*). Ensuite, la région cervicale est recousue à l'aide d'un fil de suture. Le fil d'occlusion est retiré au bout d'une heure afin de permettre la reprise de la circulation sanguine (reperfusion).

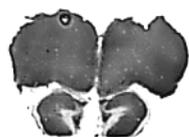
VI. Sacrifice

Après 24 heures de reperfusion, l'animal est anesthésié par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital disodique (200 mg/kg, i.p.) et son cerveau prélevé est plongé dans un bain d'isopentane à -20°C . Après 20 minutes, le cerveau est récupéré et conservé à -20°C jusqu'à son traitement par technique d'histomorphométrie, en vue de l'examen des altérations cérébrales induites par l'IRC.

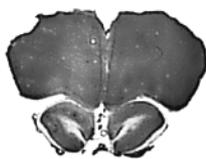
VII. Histologie

La taille de l'infarctus cérébral est déterminée par examen histologique (Deplanque *et al.*, 2003). L'histomorphométrie permet la vérification et la quantification de l'ischémie cérébrale.

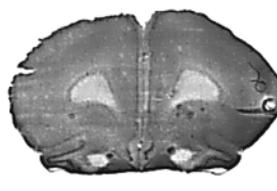
Des coupes frontales du cerveau de $20\mu\text{m}$ sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica CM3050S) suivant douze stades bien précis séparés par un intervalle de 1mm à partir des données de l'atlas de stéréotaxie de Paxinos et Watson (1986) (*Fig. 18*).



Coupe 1: 4 lobes



Coupe 2: Réunion des feuilletts



Coupe 3: Apparition du corps calleux



Coupe 4: Apparition du striatum

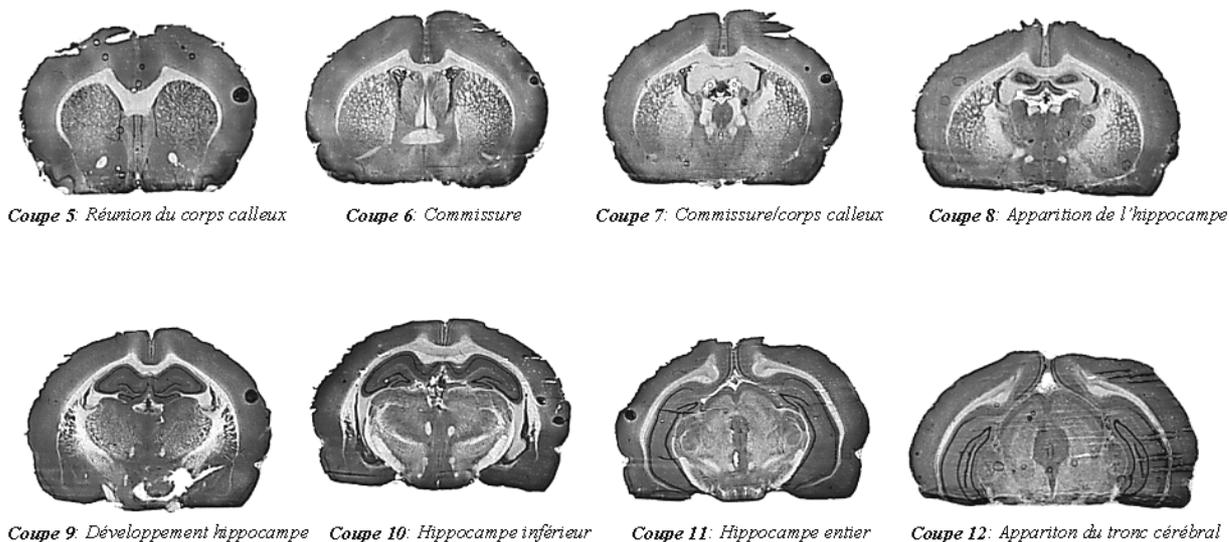


Fig 18 : Douzes stades des coupes histomorphométriques nécessaires au calcul du volume de l'infarctus cérébral

VIII. Coloration des coupes

La coloration au crésyl violet permet de mettre en évidence la zone ischémisée (Fig. 19), puisque cette dernière ne prendra pas la coloration. En effet, le colorant utilisé est un colorant nucléaire, il ne colorera donc pas les cellules mortes de la zone d'infarctus. L'éclaircissement de la teinte de la coloration permet de mettre en évidence la diminution de la densité cellulaire des zones infarciées.

La coloration est réalisée suivant le protocole suivant :

- Fixation au FAM (formaldéhyde : 20ml ; acide acétique : 20ml ; méthanol 160ml) durant 5 minutes
- Rinçage des coupes à l'eau courante pendant 10 minutes
- Rinçage des coupes à l'eau distillée pendant 5 minutes
- Crésyl violet filtré (eau distillée : 80ml ; éthanol 100°: 20ml ; acétate de crésyl violet : 500mg) pendant 3 minutes
- Déshydratation dans des bains d'alcool de titre croissant (éthanol 70°, 95°, et 100°) d'un séjour de 30 secondes chacun, séjour une fois répété pour le dernier bain.
- Les coupes sont finalement éclaircies au Clearene durant 5 minutes
- Montage des lamelles couvre-objets avec de l'acrytol.

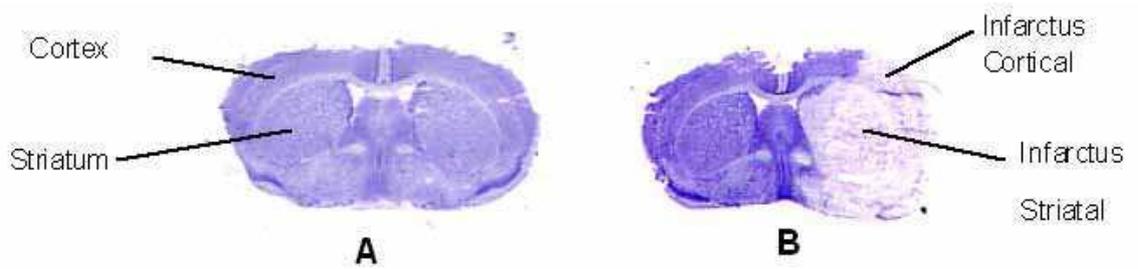


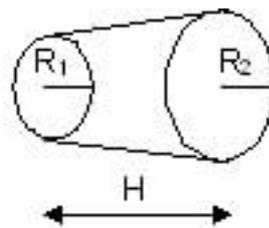
Fig. 19 : Coupes histologiques d'un cerveau d'une souris contrôle (A) et d'une souris soumise au protocole d'IRC (B)

On note bien sur la figure ci-dessus la différence de coloration entre les deux cerveaux contrôle et ischémié. La zone plus claire sur le cerveau B indique la partie infarctée du cerveau.

IX. Quantification

Les coupes histologiques sont numérisées (ordinateur Power Mac 6200/75, scanner Agfa Photoscan IISI, logiciel Adobe Photoshop) et l'aire des surfaces des hémisphères droit et gauche, ainsi que de l'infarctus cortical et sous-cortical sont mesurées à l'aide du logiciel ColorImage 1.32 (W. Rasband, NIH).

Les volumes sont calculés par intégration des surfaces mesurées selon la démarche mathématique suivante : l'intervalle entre les douze coupes de cerveau peut être considéré mathématiquement comme le volume d'un cône tronqué.



Le calcul du volume s'effectue selon la formule :

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

L'œdème cérébral est pris en compte par le calcul des volumes corrigés par le rapport par la formule suivante (Lin *et al.*, 1993) :

Volume corrigé de l'infarctus

$$= \text{Volume de l'infarctus total} \times \frac{\text{Volume de l'hémisphère gauche}}{\text{Volume de l'hémisphère droit}}$$

Cette définition 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 l'infarctus total.

Les volumes d'œdèmes sont déterminés comme étant la différence entre les volumes des hémisphères droit et gauche.

X. Extraction et dosage des protéines par la méthode de Peterson

Les cerveaux des souris ischémisées ont préalablement été prélevés en prenant soin de perfuser les souris. Le cerveau de chacune est disséqué en vue d'obtenir les zones corticales, sous corticales et hippocampales des hémisphères droit et gauche séparément. Ces échantillons sont conservés à -80°C en attendant leur traitement.

En vue de l'extraction de protéines, un tampon d'homogénéisation (tampon RIPA et inhibiteur de protéase 10%) est ajouté aux échantillons en vue d'obtenir une dilution de 10%. Le broyage des échantillons se fait sur glace grâce à l'Ultra –Turrax T25 (Janke and Kunkel Type). Après une complète homogénéisation, les échantillons restent au repos 30 minutes. Ils sont ensuite soniqués sur glace pendant 30 secondes dans le but de bien broyer toutes les structures et restent au repos durant 30 minutes. Après une centrifugation à 4°C et 13000 G, le surnageant est récupéré et les échantillons sont prêts pour le dosage de protéines.

Le dosage des protéines est réalisé suivant la méthode de Peterson (Peterson, 1977). Deux dilutions des échantillons sont réalisées dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) au dixième et au trentième. Une gamme étalon est

préparée avec du BSA (Bovine Serum Albumine) et du PBS, en vue d'obtenir les concentrations suivantes :

Gamme (mg/ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
BSA (μ l)	0	20	40	80	120	160	200
PBS (μ l)	200	180	160	120	80	40	0

50 μ l d'échantillon ou de gamme sont déposés très rigoureusement, auxquels sont ajoutés 500 μ l de réactif 1 et 250 μ l de réactif 2. Le mélange est vortexé et placé à l'étuve une demi-heure. Les réactifs sont à préparer en extemporané.

Réactif 1 :

- sulfate de cuivre : 1V
- carbonate de sodium : 1V
- eau distillée ou désionisée : 2V
- soude 0.8 N : 2V
- SDS 10% : 2V

Réactif 2 :

Réactif de Follin dilué au 6ème dans de l'eau distillée ou désionisée.

Une lecture de la densité optique est réalisée en double au spectrophotomètre à 750nm. Le blanc est fait sur le 0 de la gamme. Le coefficient de corrélation est vérifié ($r^2 > 0.96$) et la concentration de protéines par échantillon en fonction de la dilution est calculée (le coefficient de variation est $< 5\%$ pour une bonne manipulation). Les valeurs qui entrent exactement dans la gamme correspondent à la bonne dilution.

Les échantillons sont alors aliquotés en vue d'être prêt à leur utilisation future en western blot. En fonction de la référence, une solution échantillon + PBS qsp 500 µl est préparée pour obtenir la concentration désirée. La solution est complétée avec 500µl de tampon Laemmli dont 5% de β-mercapto-éthanol et est vortexée. Le mélange est mis à chauffer pendant 5 minutes à 95°C dans chauffe-tube afin de dénaturer les protéines. Chaque aliquot contient 100µg de protéine.

XI. Western Blot

XI.a. Electrophorèse et transfert de protéines

Le niveau d'expression de PDI est déterminé par analyse Western Blot.

Environ 100 µg de protéines sont chauffés dans un tampon Laemmli additionné à 5% de β-mercapto-ethanol pendant 5 min à 95°C avant leur migration sur un gel SDS-polyacrylamide 10%.

Les échantillons de protéines ainsi que les marqueurs de poids moléculaires pré-colorés (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) sont déposés au niveau de chaque ligne du gel avant leur migration durant 90 minutes à 180V. Les gels d'électrophorèse sont ensuite placés sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) entre deux feuilles de papier Whatman imbibées de tampon transfert. Le transfert est alors réalisé par application d'une différence de potentiel de 100V durant 45 minutes. A la suite de cette opération, les membranes sont colorées au rouge ponceau afin de vérifier la qualité de la migration, puis découpées en deux parties. L'une est utilisée pour la révélation de l'actine en vue d'un étalonnage, l'autre est utilisée pour la révélation de la protéine d'intérêt. Les membranes sont lavées du rouge Ponceau par un bain de PBS. Les blots sont ensuite incubés dans du lait écrémé dilué à 5% dans du PBS pendant 30 minutes à température de la pièce afin de bloquer les interactions non spécifiques protéines à protéines (type forces de van der Waals, interactions hydrophobes, forces ioniques).

XI.b. Immuno-détection de l'actine

Après blocage des sites non spécifiques, les membranes sont incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-actine dilué au 1/1000 dans du lait écrémé dilué à 5% dans du PBS. Après l'incubation, les membranes sont lavées trois fois 10 minutes dans du PBS puis incubées trois heures à température ambiante et sous agitation douce avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) dilué au 1/50000 dans du lait écrémé dilué à 5% dans du PBS. Après trois lavages de 10 minutes dans du PBS, les bandes spécifiques à l'actine sont trempées dans un réactif de détection ECL pour Western Blot (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) et ensuite révélées sur des films de chimioluminescence (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

XI.c. Immuno-détection de PDI

Après blocage des sites non spécifiques, les membranes sont incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-PDI (SPA-891, Assay Designs, Ann Arbor MI, USA) dilué au 1/500 dans du lait écrémé dilué à 5% dans du PBS. Après l'incubation, les membranes sont lavées trois fois 10 minutes dans du PBS puis incubées trois heures à température ambiante et sous agitation douce avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) dilué au 1/50000 dans du lait de mi-écrémé dilué à 5% dans du PBS. Après trois lavages de 10 minutes dans du PBS, les bandes spécifiques à l'actine sont trempées dans un réactif de détection ECL pour Western Blot (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) et ensuite révélées sur des films de chimioluminescence (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

XI.d. Quantification

Les bandes obtenues après révélation sont numérisées puis l'intensité des marquages est évaluée par densité optique grâce à l'utilisation du logiciel Adobe Photoshop 7.0. Le rapport de l'intensité du signal de la protéine d'intérêt sur celui de l'actine donne la possibilité de normaliser les valeurs de chaque échantillon.

XII. Rotarod

Le test du rotarod permet d'évaluer le déficit moteur induit par l'administration d'un composé face à la capacité des animaux à rester en place sur une barre tournante et par là même, de déterminer la dose minimale moyenne neurotoxique (dose toxique 50 ou TD₅₀). Cette toxicité minimale se réfère au déficit neurologique indiquée par l'incapacité de l'animal à rester en équilibre sur la barre tournante.



(Rotarod BIOSEB LE-8500)

L'appareil utilisé pour tester les souris est un mât cylindrique disposé horizontalement, de 3 cm de diamètre et 40 cm de longueur et tournant autour de son axe longitudinal au moyen d'un moteur à courant continu.

Le déficit neurologique (ataxie, sédation, hyperexcitabilité) est évalué par l'intermédiaire de ce test 24 heures après injection du produit évalué.

Quinze animaux ont été conditionnés au test de la barre tournante. Après conditionnement, ces animaux ont été séparés aléatoirement en trois groupes, ayant reçu chacun l'administration d'une dose de 0 (groupe témoin), 100 et 200 mg/kg de 4-HBA respectivement

Les expériences se déroulent en deux temps :

- Les souris sont placées sur la roue qui tourne à une vitesse constante de 6 RPM (Rotations par minute). Les animaux sont passés 13 fois de suite avec un temps inter-essai de 2 minutes. Pour qu'un essai soit pris en compte, la souris doit rester sur le Rotarod au minimum 2 secondes.

- Les animaux doivent rester 1 minute sur la roue tournant suivant une accélération de 4 RPM à 40 RPM en 2 minutes. Le test s'effectue en faisant 3 essais où la même accélération est délivrée.

XIII. Modèle de crises audiogènes

Ces différentes expériences sur le modèle des crises audiogènes ont été réalisées dans le laboratoire de Neuropharmacologie de la Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry.

XIII.a. Animaux

Les animaux utilisés étaient des souris femelles OF1 (Janvier, Le Genest St Isle, France), d'un poids de 20-22 grammes. Ils ont été randomisés à leur arrivée en groupe de 20 animaux par cage. Tous les groupes d'animaux utilisés dans nos expériences comportent huit animaux.

XIII.b. Régime

Après randomisation, les animaux recevront soit un régime normal, soit un régime carencé en magnésium. Le régime synthétique utilisé se base sur celui de Maurois *et al* 1989. La quantité de Magnésium est de 50mg/kg de nourriture, ce qui correspond à une carence sévère (100 étant une carence modérée, et le régime normocarencé est de 1300mg/kg) (Maurois *et al*, 1989). Une carence de 42 jours est maintenue avant la réalisation du test audiogène (Bac *et al* 1998).

XIII.c. Test audiogène

Chaque animal est placé dans une boîte en plexiglas de 9 dm³ (30cm de longueur, 20 cm de largeur, et 15 cm de hauteur). Il est exposé à un signal sonore de 10 ± 1 kHz de fréquence et de 90 ± 1dB en intensité et d'une durée de 15 secondes. Ce stimulus sonore est produit par un générateur acoustique et est renvoyé par un haut parleur de haute fréquence placé au dessus de la boîte en plexiglas. Le taux de décibel est mesuré. Chaque animal ne reçoit qu'une crise audiogène par expérimentation.

XIII.d. Administration des produits

4-HBA est administré en solution saline, ou par voie ip. 1/2 heure avant le test audiogène. Les 3 dérivés flavonoïdes (6 hydroxyflavanone [6-HFN], la flavanone (2,3-dihydroflavone) et la 6 hydroxyflavone) ont été administrés par voie ip en solubilisation dans le DMSO (volume de DMSO finalement injecté à l'animal ne dépassant jamais 25ml par souris de 25 g) 1/2 heure avant le test audiogène.

La dose efficace 50 (DE₅₀) des produits les plus actifs (4-HBA et 6-HFN), à savoir la dose protégeant la moitié des animaux soumis au test audiogène contre le développement d'une crise convulsive, a été déterminée comme décrit dans les travaux de Bac *et al.*, (1998) et Vamecq *et al.*, (2003).

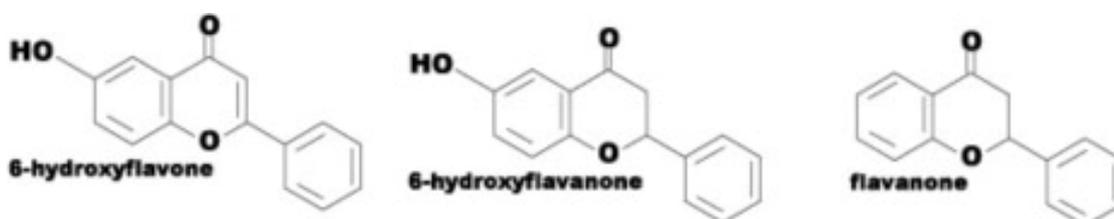


Fig 20 - Structure chimique des composés évalués dans le test des crises audiogènes chez l'animal déficient en magnésium

XIV. Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyennes affectées de l'erreur standard sur la moyenne. Les volumes d'infarctus sont comparés en effectuant une analyse de variance ANOVA à un facteur suivi par un test de Fischer post-hoc Protected Least Significant Difference (PLSD). Pour l'ensemble de ces données, le niveau de significativité choisi est de $p < 0,05$.

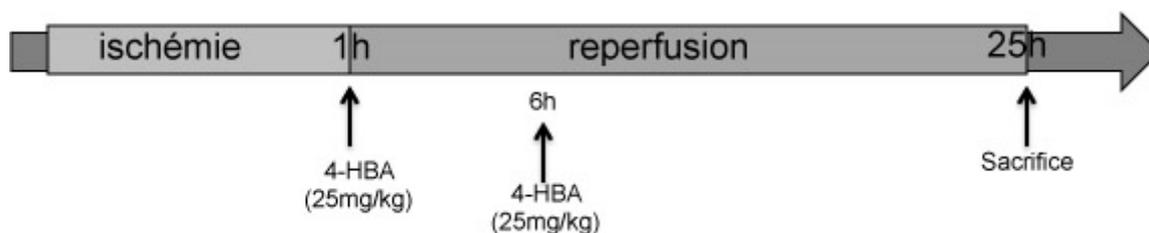
XV. Protocoles

XV.a. Protocoles appliqués lors de l'IRC

Les différents protocoles réalisés dans le cadre de l'ischémie reperfusion cérébrale sont les suivants. Il est à noter que pour chaque groupe étudié, le nombre d'animaux est de 6 animaux.

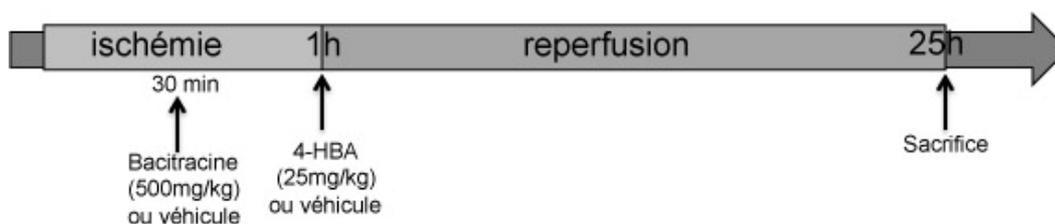
XV.a.1. Effet du 4 HBA dans l'IRC

La 4-HBA ou le véhicule (solution saline 0,9%) était administrée au moment de la reperfusion (1h après le début de l'ischémie) et une seconde injection était réalisée 6h après la reperfusion. Ces deux injections étaient réalisées par voie intraveineuse. Les doses de 4-HBA injectées étaient de 25 mg/kg. Les animaux étaient sacrifiés 24 heures après la reperfusion.



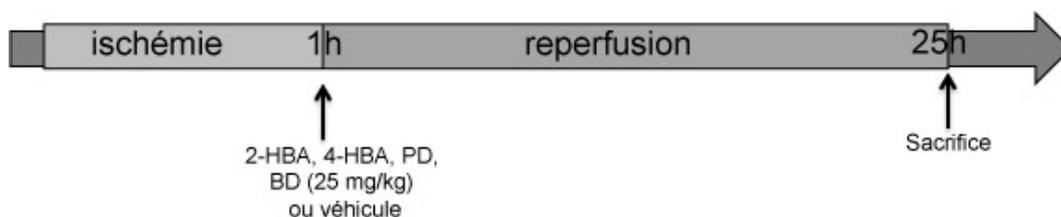
XV.a.2. Effet de la bacitracine dans l'IRC

La bacitracine à une dose de 500 mg/kg ou le véhicule (solution saline 0,9%) était injecté aux animaux par voie intramusculaire une demi-heure après le début de l'ischémie. Le 4-HBA ou le véhicule (solution saline 0,9%) était administré par voie intraveineuse au moment de la reperfusion à une dose de 25 mg/kg. Les animaux étaient sacrifiés 24 heures après la reperfusion.



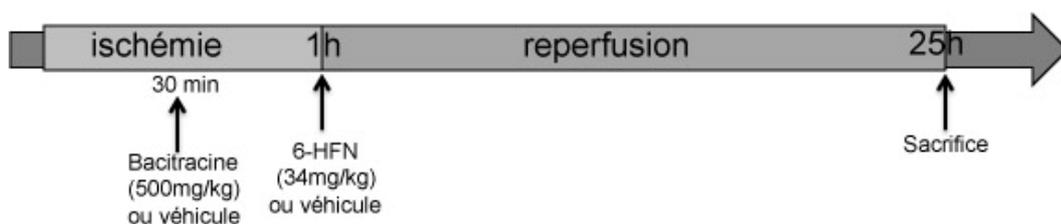
XV.a.3. Effet des isomères de position, des analogues linéaires

Les composés étaient administrés au moment de la reperfusion par voie intraveineuse. Pour tous les composés, la dose administrée était de 25 mg/kg. Les animaux étaient sacrifiés 24 heures après la reperfusion.



XV.a.4. Effet de la 6-HFN dans l'IRC

La bacitracine à une dose de 500 mg/kg ou le véhicule (solution saline 0,9%) était injecté aux animaux par voie intramusculaire une demi-heure après le début de l'ischémie. Le 6-HFN ou le véhicule (DMSO) était administré par voie intraveineuse au moment de la reperfusion à une dose de 34 mg/kg. Les animaux étaient sacrifiés 24 heures après la reperfusion.



XV.b. Protocoles appliqués lors des western blots

XV.b.1. Comparaison de l'induction de PDI par 4-HBA et par l'ischémie

Quatre groupes d'animaux ont été comparés :

Dans les deux premiers groupes, les animaux non ischémiés recevaient par injection intraveineuse soit 25mg/kg de 4-HBA soit le véhicule (solution saline 0,9%)

Dans les deux autres groupes, les animaux ischémiés recevaient par injection intraveineuse soit 25mg/kg de 4-HBA soit le véhicule (solution saline 0,9%) au moment de la reperfusion (après 1 heure d'ischémie).

Quelque soit le groupe, les animaux étaient sacrifiés 24 heures après l'injection.

XV.b.2. Cinétique d'induction de PDI par 4-HBA

Le 4-HBA était injecté à une dose de 25 mg/kg par voie intraveineuse 0, 6, 15 ou 24 heures avant le sacrifice des animaux.

XV.b.3. Effet de la bacitracine, de 2-HBA et 3-HBA et de la 6-HFN

Mêmes protocoles d'administration que pour les expérimentations en IRC

XV.c. Protocoles appliqués lors des tests de la barre tournante (rotarod)

Les animaux recevaient le 4-HBA à différentes doses (0, 100 et 200 mg/kg) 24 heures avant le test. Pour chaque groupe, l'effectif se chiffre à 5 animaux.

Un préconditionnement était réalisé 6 heures avant l'injection. Pour ce préconditionnement, les souris devaient rester une minute sur la barre tournant à une vitesse de 6 rotations par minute.

Pendant le premier test, les animaux devaient reproduire ce qu'ils avaient appris lors du préconditionnement. Lors du second test, les animaux devaient rester une minute sur la barre tournant avec une accélération de 4 à 40 rotations par minutes en 2 minutes.

RESULTATS

Pour évaluer les différentes molécules abordées lors de ce travail, nous avons suivi le schéma d'étude suivant :

Les molécules ont tout d'abord été évaluées dans le modèle d'IRC murin, pour leur effet neuroprotecteur ainsi que pour leur effet anti-œdémateux potentiel. Dans le cas particulier du 4-HBA, nous avons testé dans ce modèle d'IRC l'effet d'une seule administration mais aussi de deux injections du composé.

Par la suite, des expériences de western blot ont été conduites dans le but d'étudier l'induction de la PDI sur des animaux sains par les différentes molécules (sauf dans le cas des analogues linéaires du 4-HBA pour lesquels ces expériences n'ont pas été menées). Dans le cas du 4-HBA, molécule cible de notre étude, l'importance du temps de reperfusion et donc de la durée du traitement sur l'induction de la PDI a été évalué par une étude cinétique.

4-HBA a aussi bénéficié d'une étude dans le modèle de crise audiogène ainsi que des mesures de neurotoxicité par le test de la barre tournante (rotarod).

Dans cette section, les différents résultats obtenus vous seront présentés, molécule par molécule.

I. Etude de la 4-HBA, inducteur de PDI

1.a. Ischémie reperfusion cérébrale

1.a.1. Effet protecteur de 4-HBA

L'effet neuroprotecteur de 4-HBA a été évalué dans le modèle d'ischémie reperfusion cérébrale. Cette étude a été réalisée en deux temps, en évaluant l'effet d'une seule ou de deux injections de 4-HBA (la première au moment de la reperfusion et la seconde 6 heures après la reperfusion). Cette double injection avait été réalisée pour déterminer si un effet additionnel serait observé dans le cas d'une seconde administration du composé. La figure suivante (*Fig. 21*) montre les différentes coupes histomorphométriques réalisées suivant les douze niveaux décrits dans la section matériel et méthode.

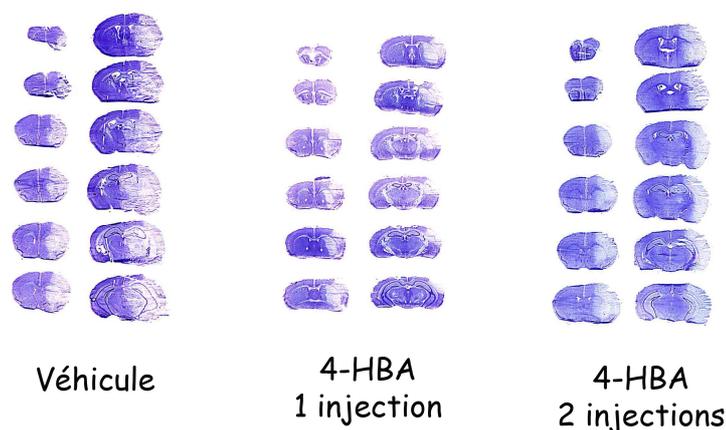


Fig.21 : Coupes histomorphométriques d'un cerveau de souris pour les animaux ayant reçu le véhicule et le 4-HBA suivant une seule ou deux injections

Sur ces coupes, on observe une taille des lésions ischémiques réduite pour les animaux ayant reçu les 4-HBA suivant une ou deux administrations en comparaison des animaux témoins.

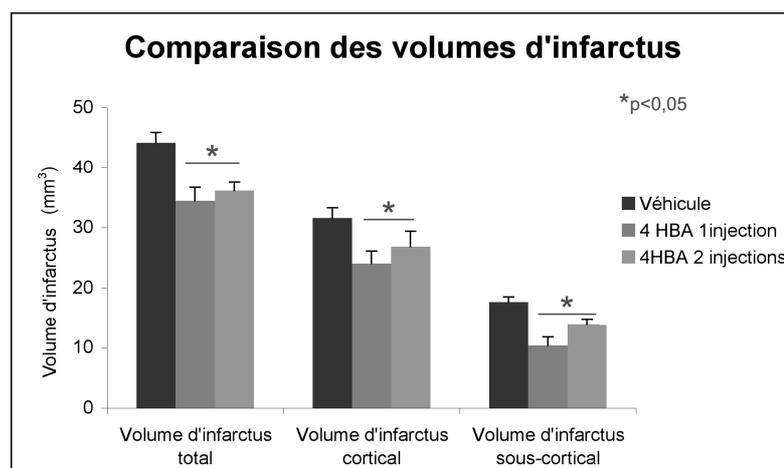


Fig. 22 : Comparaison des volumes d'infarctus totaux, corticaux et sous-corticaux des animaux témoins, et des animaux ayant reçu une ou deux injections de 4-HBA

Au niveau des valeurs de volumes d'infarctus, on note une diminution significative des volumes d'infarctus totaux, corticaux et sous-corticaux de respectivement 22%, 24% et 41% pour les animaux ayant reçu une seule injection de 4-HBA par rapport aux animaux témoins (Fig. 22).

Lorsqu'une deuxième injection de 4-HBA est réalisée 6 heures après la reperfusion et donc après la première administration de 4-HBA, on note une

diminution significative des volumes d'infarctus totaux, corticaux et sous-corticaux de 18%, 14% et 21% respectivement par rapport au groupe témoin.

On ne remarque aucune différence significative entre les groupes d'animaux ayant reçu une seule ou deux injections de 4-HBA, ce qui montre que la seconde injection de 4-HBA n'apporte pas d'effet neuroprotecteur supplémentaire.

I.a.2. Effet anti-œdémateux

Le potentiel anti-œdémateux du 4-HBA a été étudié pour une seule ou deux injections du composé à la reperfusion et 6 heures après celle-ci.

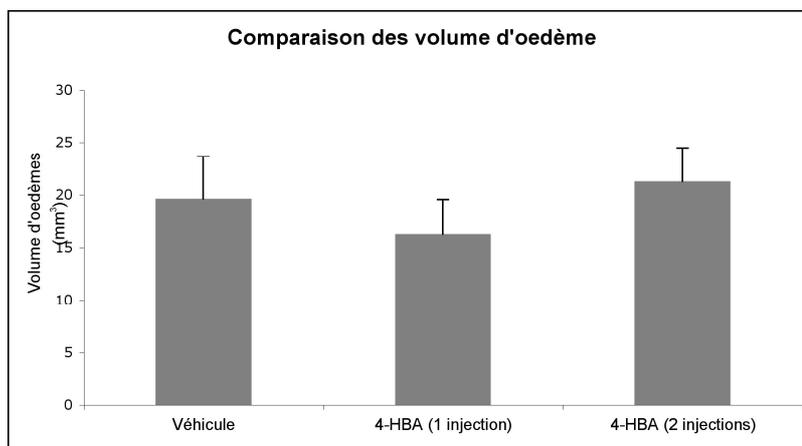


Fig. 23 : Comparaison des volumes d'œdème des animaux témoins et des animaux ayant reçu une ou deux injections de 4-HBA

L'administration de 4-HBA, que ce soit par une ou deux injections, n'affecte pas le volume d'œdème observé après l'ischémie reperfusion cérébrale de manière significative (*Fig. 23*) Le 4-HBA ne montre donc pas d'effet anti-œdémateux quand il est administré dans le modèle d'IRC.

Comme une seconde injection de 4-HBA n'apporte pas d'effet neuroprotecteur supplémentaire, le reste du travail portera donc sur des animaux auxquels une seule injection de 4HBA est réalisée.

I.b. Effet sur PDI

I.b.1. Effet de l'IRC sur PDI en comparaison de 4-HBA

L'induction de la PDI a été évaluée par western blot dans différentes conditions ischémiques ou non, ainsi que sur des animaux ayant reçu ou non le 4-HBA. Nous voulions déterminer si l'induction de la PDI lors de l'IRC était majorée ou non par l'administration de 4-HBA.

Sur la figure suivante (*Fig. 24*), les niveaux de PDI pour les différentes zones cérébrales sont comparés suivant l'IRC ou non et suivant l'administration de 4-HBA ou non, en regardant les gels obtenus en western blot.

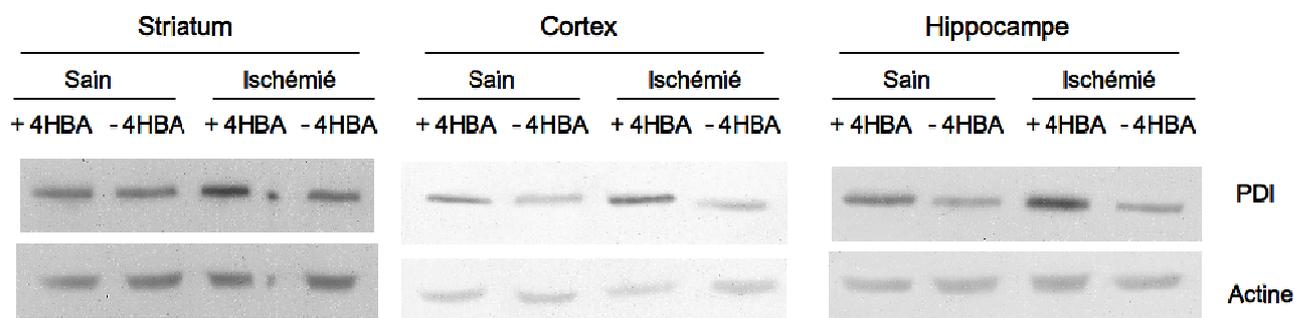


Fig. 24 : Effet de l'induction de PDI par l'IRC et/ou l'administration de 4-HBA en western blot

Le graphique de la figure 25 compare les pourcentages de densité optique obtenus pour les différents groupes par rapport au groupe témoin (animaux non ischémiés n'ayant pas reçu le 4-HBA).

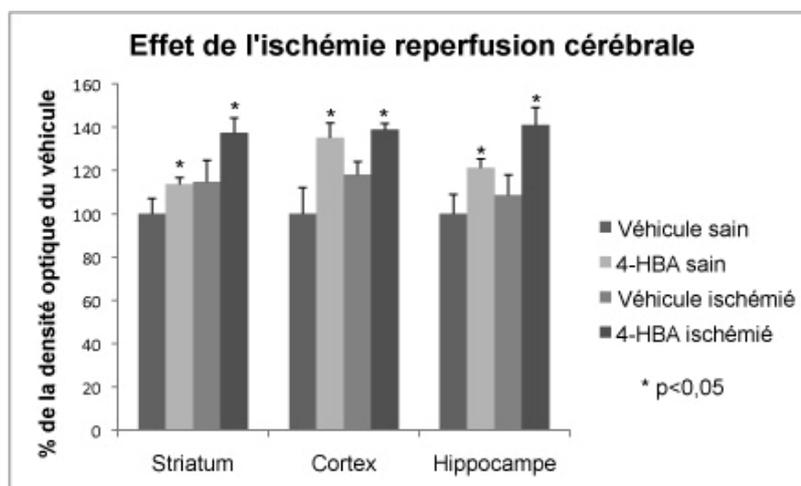


Fig. 25 : Induction de la PDI chez les animaux sains et ischémiés ayant reçu ou non 4-HBA

On remarque une induction significative de la PDI provoquée par l'ischémie reperfusion cérébrale de 14% pour le striatum, de 15% pour le cortex et de 21% pour l'hippocampe ; mais aussi une induction de la PDI de 15% pour le striatum, de 18% pour le cortex et de 10% pour l'hippocampe par l'administration de 4-HBA. L'administration de 4-HBA combinée à l'IRC montre une augmentation plus importante de l'induction de la PDI. On observe un effet additif puisque l'administration de 4-HBA lors de l'IRC apporte une induction de 38% pour le striatum, de 39% pour le cortex et de 40% pour l'hippocampe.

I.b.2. Cinétique d'induction de PDI par 4-HBA

Lors de cette étude, les animaux sains recevaient le 4-HBA 6, 15 ou 24 heures avant le sacrifice. La mesure de l'induction de la PDI était alors réalisée. Ces expériences avaient pour but d'évaluer l'effet du traitement sur l'induction de la PDI dans le temps.

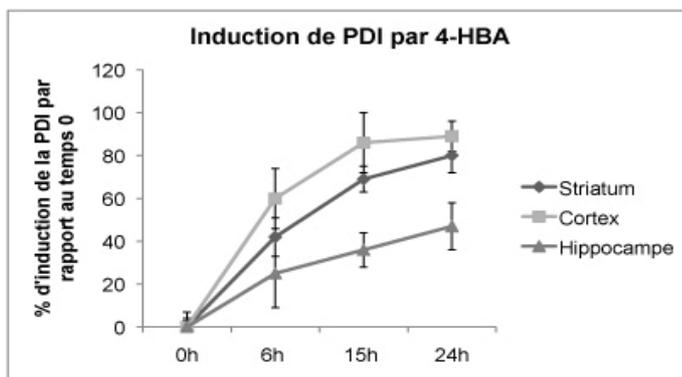


Fig. 26 : Etude cinétique par western blot de l'induction de PDI par 4-HBA à 6, 15 et 24 heures après l'administration de 4-HBA

On remarque que l'induction de la PDI est augmentée en fonction du temps du traitement (Fig. 26). Cette induction est de 42%, 60% et 25% après 6 heures pour les niveaux striataux, corticaux et hippocampaux ; de 69%, 86% et 36% respectivement après 15 heures ; et de 80%, 88% et 47% respectivement après 24 heures.

I.c. Test de la barre tournante - Rotarod (toxicité minimale)

Le test de la barre tournante permet d'évaluer le déficit moteur induit par l'administration du 4-HBA face à la capacité des animaux à rester en place sur une barre tournant à une vitesse de 6 rotations par minute, et par là de déterminer la dose minimale moyenne neurotoxique (TD₅₀). Cette toxicité minimale se réfère au déficit neurologique indiqué par l'incapacité de l'animal à rester en équilibre sur la barre tournante.

Quinze animaux ont été conditionnés au test de la barre tournante. Après conditionnement, ces animaux ont été séparés aléatoirement en trois groupes, ayant reçu chacun l'administration d'une dose de 0 (groupe témoin), 100 et 200 mg/kg respectivement.

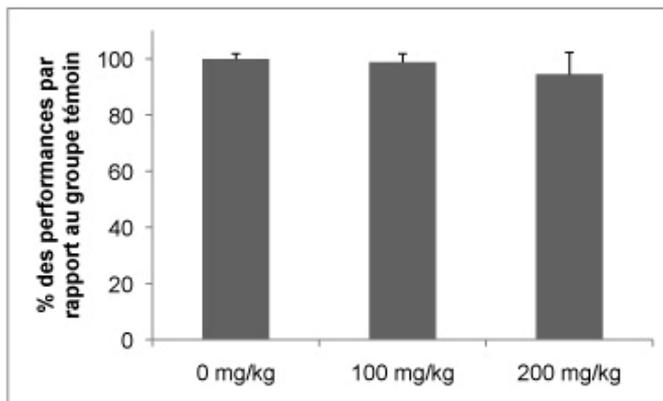


Fig. 27 : Pourcentage des performances des animaux ayant reçu une dose de 100 et 200 mg/kg par rapport aux animaux ayant reçu le véhicule pour le test de la barre tournante à une vitesse de 6rpm

Nous n'avons observé aucune diminution significative des performances des animaux en comparaison aux animaux témoins (*Fig. 27*), ce qui nous a amené à réaliser un second test. Dans ce test, la roue tournante subissait une accélération pour passer de 4 à 40 rotations en deux minutes. L'animal devait rester une minute sur cette roue.

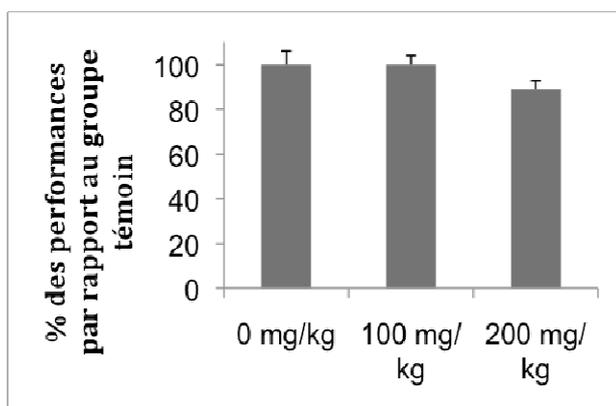


Fig. 28 : Pourcentage des performances des animaux ayant reçu une dose de 100 et 200 mg/kg par rapport aux animaux ayant reçu le véhicule pour le test de la barre tournante suivant une accélération de 4 à 40 rpm.

Lors de ce test, les animaux ayant reçu une dose de 100 et de 200 mg/kg de 4-HBA ne montre pas des performances significativement diminuées en comparaison aux animaux ayant reçu le véhicule (0 mg/ kg de 4-HBA) (*Fig. 28*).

Ces données nous indiquent que le 4-HBA n'est pas toxique au niveau des performances motrices des animaux et ce jusqu'à des doses de 200 mg/kg. Ce qui veut dire que la dose toxique du 4-HBA se situe au delà de cette concentration.

I.d. Modèle de crise audiogène chez la souris déficiente en magnésium

Cette étude dans le modèle des crises audiogènes a permis l'étude comparative des protections offertes par l'alcool 4-hydroxybenzylique et la 6-hydroxyflavanone. (voir paragraphe suivant).

I.d.1. Description du modèle

Le modèle des tests MDDAS (Magnesium Deficiency-Dependent Audiogenic Seizure ou crise audiogénique dépendante d'une déficience en magnésium) représente un test sensible aux basses concentrations des composés antiépileptiques (AED), se montre réactif face aux activités anti-convulsivantes des AED, et fournit une estimation des propriétés neuroprotectrices des composés testés (Bac *et al.*, 1998). MDDAS est de plus un modèle de stress oxydant généralisé dû à l'accumulation de l'anion superoxyde.

Le modèle de crise audiogène associé à un déficit en magnésium répond aux mécanismes anti-convulsivants mais aussi aux propriétés antioxydantes des molécules. C'est un modèle dans lequel 4-HBA pourra être évalué, au vu de ses propriétés antioxydantes connues.

L'organisation dans le temps des événements caractérisant les crises audiogéniques a été étudiée en détail chez les souris adultes déficientes en magnésium. L'évolution générale a été décrite par Seyfried *et al.* (1986). Il consiste en une séquence progressive de différentes phases :

Tout d'abord une courte période de latence est mise en place par l'initiation de la stimulation sonore, ensuite le début d'une course folle frénétique. Cette phase de course frénétique progresse vers une séquence clonique, commençant avec la chute de la souris sur son côté, et caractérisé par de violents battements des pattes. Cette séquence clonique est suivie par une séquence tonique durant laquelle les pattes antérieures et par la suite les pattes postérieures se tendent de façon rigide vers l'arrière. Après cette phase clonique-tonique, une phase de récupération prend place avant que l'animal ne récupère son activité locomotrice normale. La figure 29 reprend la chronologie des ces événements, par une illustration de la fin de la phase

de course folle, de la phase de convulsion et du début de la phase de récupération (Bac *et al.*, 1998).

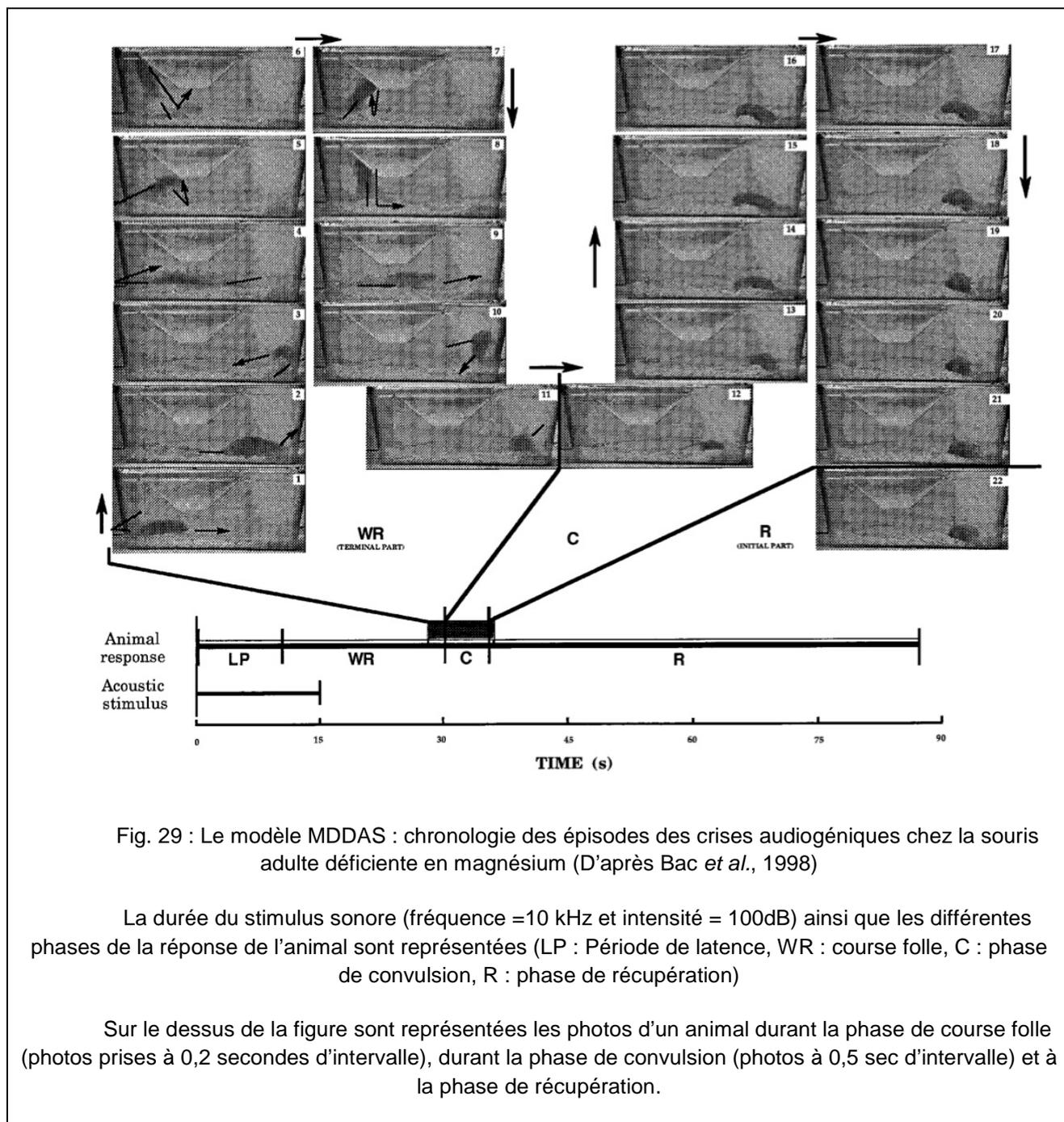


Fig. 29 : Le modèle MDDAS : chronologie des épisodes des crises audiogéniques chez la souris adulte déficiente en magnésium (D'après Bac *et al.*, 1998)

La durée du stimulus sonore (fréquence = 10 kHz et intensité = 100dB) ainsi que les différentes phases de la réponse de l'animal sont représentées (LP : Période de latence, WR : course folle, C : phase de convulsion, R : phase de récupération)

Sur le dessus de la figure sont représentées les photos d'un animal durant la phase de course folle (photos prises à 0,2 secondes d'intervalle), durant la phase de convulsion (photos à 0,5 sec d'intervalle) et à la phase de récupération.

I.d.2. Résultats

Dans le test des crises audiogènes chez la souris déficiente en magnésium, le 4-HBA s'avère doté d'une DE₅₀ de 25 mg/kg.

II. Etude de la 6-HFN

La protection de la 6-hydroxyflavanone (6-HFN), une molécule de référence dans le test des crises audiogènes, a été comparée à celle du 4-HBA.

II.a. Ischémie reperfusion cérébrale

II.a.1. Effet protecteur de 6-HFN

Cette molécule de 6-HFN a été évaluée dans le modèle d'IRC, dans le but de déterminer un effet neuroprotecteur possible de la molécule. De plus comme cette molécule est comparée au 4-HBA, qui est inducteur de la PDI, nous avons combiné son administration à celle de la bacitracine, inhibiteur de PDI, en vue d'observer une possible modification dans l'effet obtenu et si un effet sur la PDI pouvait être envisagé

Dans ce modèle, les composés furent évalués à la DE_{50} enregistrée dans le test audiogène (voir point 2.c). Sur la figure 30 sont représentées les coupes histomorphométriques du cerveau d'une souris de chacun des groupes étudiés (véhicule, 6-HFN seul, bacitracine seule et 6-HFN co-administré avec la bacitracine).

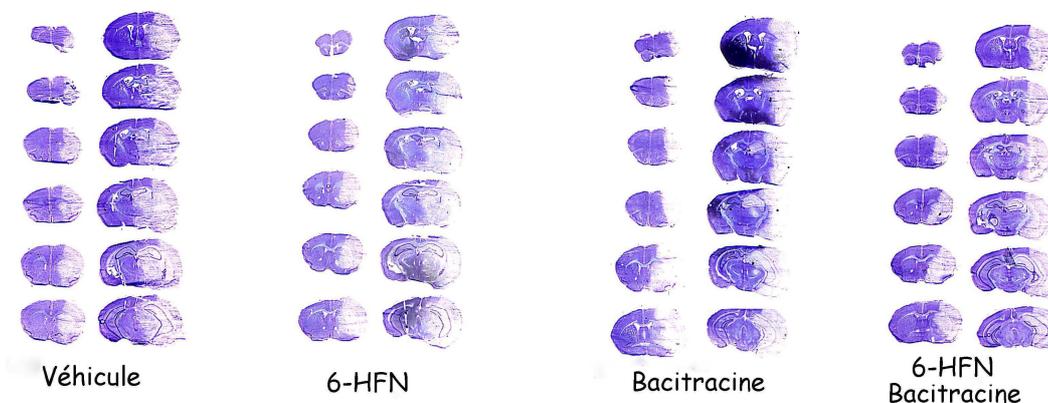


Fig. 30 : Coupes histomorphométriques d'un cerveau de souris pour les animaux ayant reçu le véhicule et le 6-HFN seul, la bacitracine seule ou le 6-HFN co-administré avec la bacitracine

Sur ces coupes, on n'observe aucune modification au niveau de la taille des lésions ischémiques pour les différents groupes d'animaux étudiés.

Comparaison des volumes d'infarctus

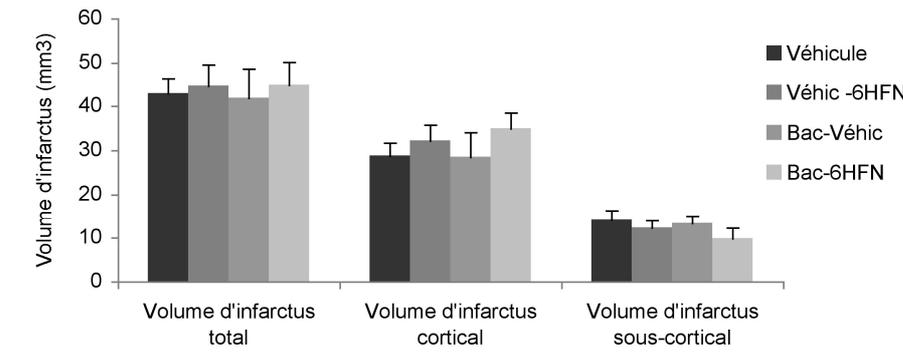


Fig. 31 : Comparaison des volumes d'œdème des animaux témoins, des animaux ayant reçu le 6-HFN ou la bacitracine seuls, ou la bacitracine combinée au 6-HFN

La 6-HFN dans le modèle d'ischémie reperfusion cérébrale n'a aucun effet neuroprotecteur significatif par rapport au groupe d'animaux témoins (*Fig. 31*). Les résultats combinant la 6-HFN et la bacitracine n'apportent aucune modification significative au niveau de la taille des lésions ischémiques, ce qui nous indique que la 6-HFN devrait être inactive au niveau de la PDI. Ces observations seront vérifiées par western blot.

II.a.2. Effet anti-œdémateux de 6-HFN

Le potentiel anti-œdémateux du 6-HFN a été étudié dans le modèle d'IRC par l'administration du composé seul, ou combiné à la bacitracine. Dans ce modèle, la bacitracine seule a aussi été étudiée comme groupe témoin en comparaison du groupe d'animaux recevant le 6-HFN en co-administration avec la bacitracine.

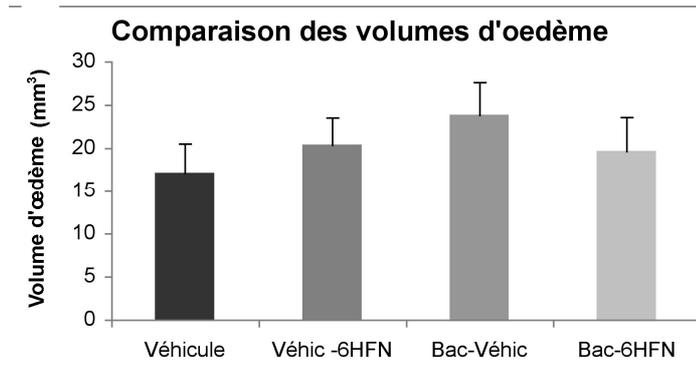


Fig. 32: Comparaison des volumes d'œdème des animaux témoins et les animaux ayant reçu la 6-HFN seule, la bacitracine seule et la 6-HFN en co-administration avec la bacitracine

La 6-HFN seul ou en combinaison avec la bacitracine n'apporte aucune amélioration au niveau du volume d'œdème mesuré lors de l'ischémie reperfusion cérébrale (Fig. 32). On en déduit donc que la 6-HFN n'apporte aucun effet anti-œdémateux lors de l'IRC.

II.b. Effet sur PDI

La 6-HFN a été étudiée en western blot pour déterminer s'il pouvait avoir un effet sur la PDI.

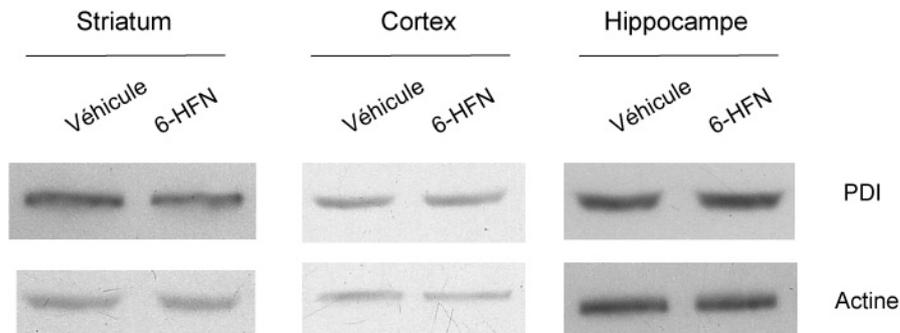


Fig. 33 : Effet de l'induction de PDI par la 6-HFN en western blot

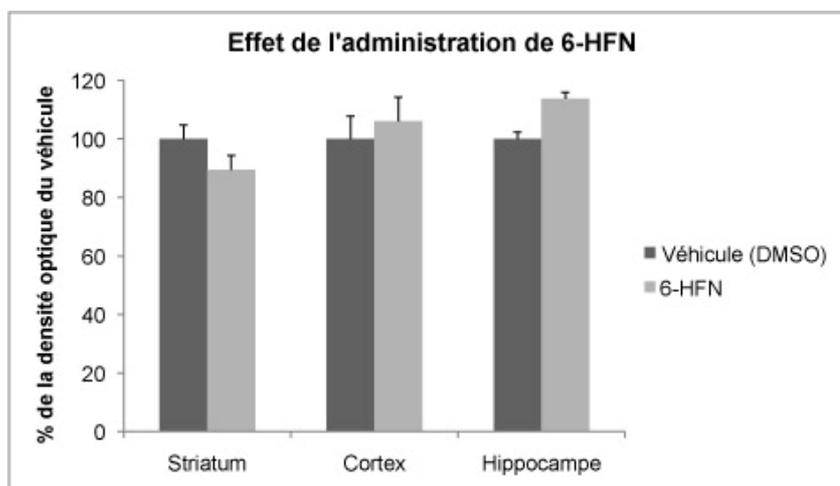


Fig. 34 : Induction de la PDI chez les animaux sains ayant reçu le véhicule ou la 6-HFN

Il s'est avéré que la 6-HFN ne possédait pas d'effet sur cette protéine (Fig. 33), puisque les niveaux de la protéine en présence de 6-HFN ou juste du véhicule (DMSO dans ce cas) ne montraient pas de différence significative (Fig. 34).

II.c. Modèle des crises audiogènes (chez la souris déficiente en magnésium)

La protection de trois composés flavonoïdes incluant la 6-hydroxyflavanone (6-HFN), la flavanone et la 6-hydroxyflavone a été comparée à celle du 4-HBA, faisant apparaître que la 6-HFN était le composé le plus actif contre les crises audiogènes. Sa dose efficace 50 (DE₅₀) était de 34 mg/kg. A cette dose, la flavanone et la 6-hydroxyflavone assuraient, respectivement, une protection de 36 et 25 % seulement des animaux soumis au test audiogène. Dans ce modèle, le 4-HBA montrait de meilleurs résultats.

III. Etude de la bacitracine, inhibiteur de PDI

La bacitracine, qui est reconnue comme étant un inhibiteur de la PDI, a été étudiée dans le modèle d'IRC dans le but de déterminer si l'effet protecteur du 4-HBA est altéré ou pas lors de son administration.

L'effet de la bacitracine sur PDI a été étudié par western blot, avec et sans administration de 4-HBA. Ces expériences nous permettaient de vérifier l'effet de la

bacitracine sur la PDI et d'estimer si la bacitracine inhibe l'induction de la PDI par le 4-HBA.

III.a. Ischémie reperfusion cérébrale

III.a.1. Effet protecteur de la bacitracine

L'effet de la bacitracine a été évalué dans le modèle d'ischémie reperfusion cérébrale. Durant ces expérimentations, nous avons comparé l'effet de la bacitracine avec celui du 4-HBA administré seul, ainsi que la bacitracine administrée conjointement au 4-HBA.

La figure 35 montre les coupes du cerveau d'une souris pour chacun des groupes étudiés.

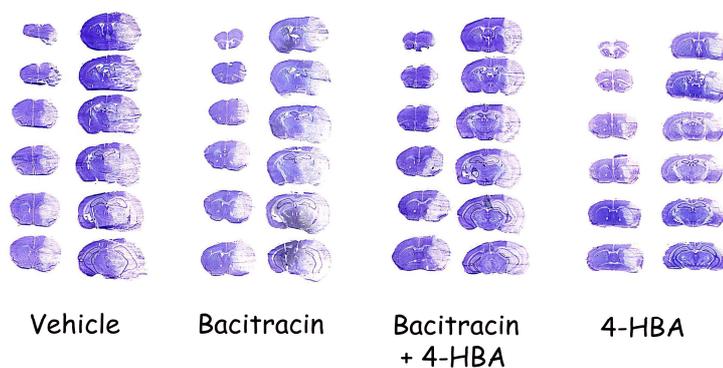


Fig. 35 : Coupes histomorphométriques d'un cerveau de souris pour les animaux ayant reçu le véhicule, la bacitracine seule, la bacitracine combinée au 4-HBA et le 4-HBA seul.

On ne note sur ces coupes aucune amélioration de la taille d'infarctus pour les animaux qui avaient reçu la bacitracine, que celle là soit seule ou en co-administration avec 4-HBA.

Les volumes d'infarctus sont représentés dans l'histogramme suivant (Fig. 36) :

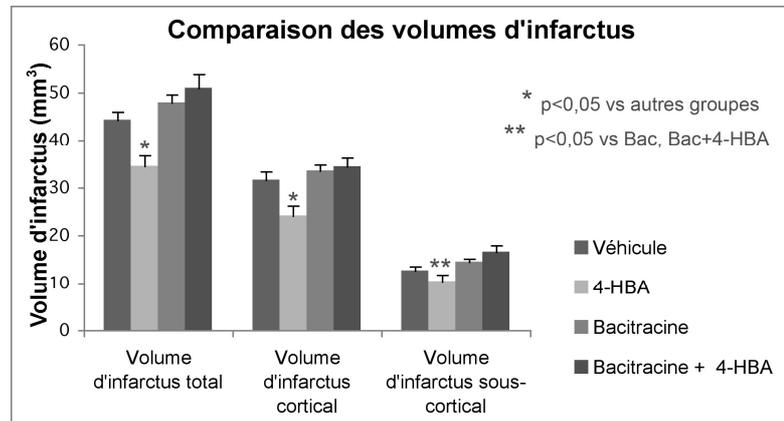


Fig. 36 : Comparaison des volumes d'infarctus totaux, corticaux et sous-corticaux des animaux témoins, et des animaux ayant reçu 4-HBA seul, la bacitracine seule et 4-HBA combiné à la bacitracine

Si l'on compare les différentes valeurs obtenues en termes de volume d'infarctus, on remarque que les différents groupes ayant reçu la bacitracine ne montrent aucune amélioration au niveau des volumes d'infarctus. On note même une légère tendance à une augmentation non significative de ces volumes d'infarctus totaux, corticaux et sous-corticaux de respectivement 6,%, 4% et 10 % pour les animaux ayant reçu la bacitracine seule ; et de 13%, 8%,et 20% pour les animaux ayant reçu la bacitracine associée au 4-HBA.

En ce qui concerne les animaux ayant reçu le 4-HBA seul, on note, comme précédemment (point 1.a) une diminution de ces volumes de 23%, 24% et 21 % respectivement.

L'administration de la bacitracine dans le modèle d'IRC annule donc l'effet protecteur que nous observons lors de l'administration du 4-HBA.

III.a.2. Effet anti-œdémateux

L'impact de la bacitracine sur le volume d'œdème a été étudié dans le modèle d'IRC. Comme le 4-HBA ne possède pas d'effet au niveau de l'œdème, il est intéressant de vérifier si un inhibiteur de la bacitracine n'exacerbe pas le volume d'œdème. Ce volume a été mesuré pour les groupes d'animaux ayant reçu le 4-HBA seul, la bacitracine seule et en co-administration avec le 4-HBA.

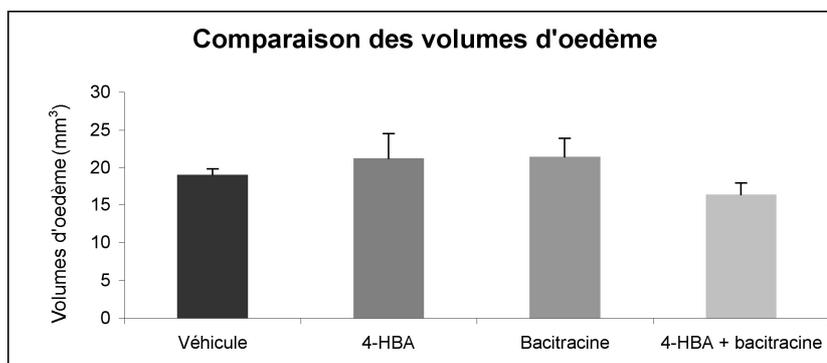


Fig. 37 : Comparaison des volumes d'œdème des animaux témoins, des animaux ayant reçu le 4-HBA ou la bacitracine seuls, ou la bacitracine combinée au 4-HBA

On ne remarque aucune modification significative des volumes d'œdèmes pour les animaux ayant reçu la bacitracine ou la bacitracine combinée au 4-HBA (Fig. 37).

De plus, nous ne retrouvons ici que les résultats obtenus pour l'administration de 4-HBA seul, à savoir que cette molécule n'affecte pas le volume d'œdème observé après l'ischémie reperfusion cérébrale

III.b. Effet sur PDI

Comme nous venons de voir que l'administration de la bacitracine annule l'effet neuroprotecteur du 4-HBA dans le modèle d'IRC et comme la bacitracine est une inhibitrice de la PDI, nous voulions déterminer l'effet de la bacitracine sur l'induction de la PDI observée lors de l'administration du 4-HBA.

Le niveau d'expression de la PDI a été mesuré par western blot pour les quatre groupes d'animaux sains, c'est-à-dire non ischémiés (animaux témoins, animaux ayant reçu le 4-HBA seul, animaux ayant reçu la bacitracine seule et animaux ayant reçu le 4-HBA combiné à la bacitracine).

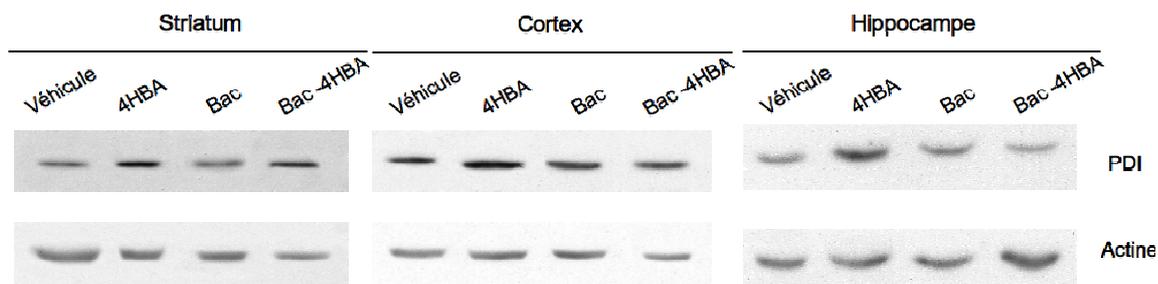


Fig. 38 : Effet de l'induction de PDI pour les quatre groupes étudiés par western blot

Au niveau des gels des westerns blots, nous observons que l'expression de PDI ne semble pas modifiée par l'administration de la bacitracine, que ce soit seule ou en co-administration avec le 4-HBA, par rapport au niveau de la PDI pour les animaux témoins (*Fig.38*). En revanche, l'administration de 4-HBA seule montre une augmentation du niveau de PDI.

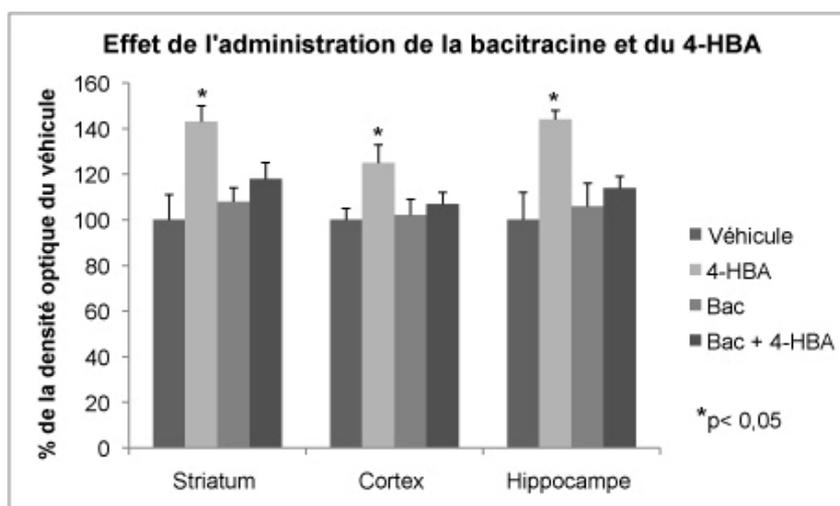


Fig. 39 : Induction de la PDI chez les animaux sains ayant reçu le véhicule, le 4-HBA ; la bacitracine et la bacitracine associée au 4-HBA

Au niveau des pourcentages d'induction de la PDI par rapport au véhicule, nous observons donc que l'administration de la bacitracine abroge l'effet d'induction de la PDI observé par l'administration de 4-HBA. Les valeurs de pourcentage obtenues pour les groupes d'animaux ayant reçu la bacitracine seule sont similaires à celles du véhicule (*Fig. 39*). Une tendance non significative est observée pour les groupes ayant reçu la bacitracine en co-administration avec le 4-HBA, avec des pourcentages de 18%, 7% et 14% respectivement pour les niveaux de PDI striatal,

cortical et hippocampal. On confirme ici l'induction de la PDI par le 4-HBA, avec une augmentation du niveau de PDI de 43%, 25%, et 44% pour les niveaux de PDI striatale, corticale et hippocampale.

IV. Etude des isomères de position de 4-HBA

Etant donné que 4-HBA apporte un effet neuroprotecteur lors de l'ischémie reperfusion cérébrale, nous avons évalué d'autres molécules dans ce modèle et notamment les isomères de position de 4-HBA, à savoir l'alcool 2-hydroxybenzylique (2-HBA) et l'alcool 3-hydroxybenzylique (3-HBA). Tester ces molécules nous servira à déterminer l'importance de la position du groupement hydroxyle -OH sur le cycle benzénique dans l'effet neuroprotecteur observé.

IV.a. Ischémie reperfusion cérébrale

IV.a.1. Effet protecteur des isomères de position

L'étude des isomères de position de 4-HBA dans le modèle d'IRC est illustrée à la figure 40, suivant les douze coupes caractéristiques. Y sont représentées les coupes d'un cerveau de souris pour les groupes témoin (véhicule), 4-HBA, 3-HBA et 2-HBA.

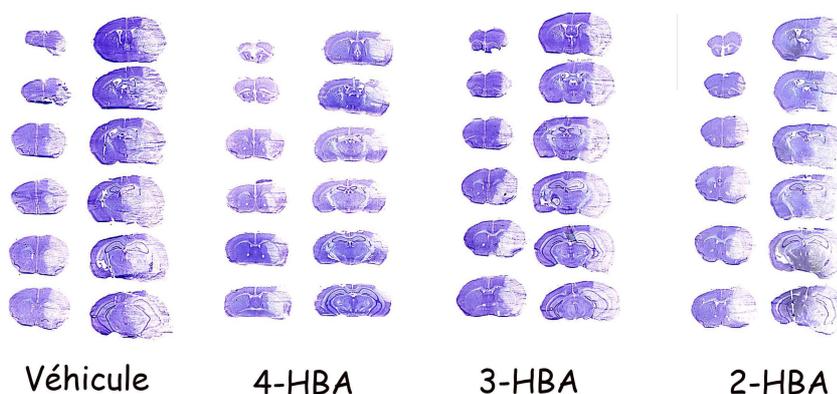


Fig. 40 : Coupes histomorphométriques d'un cerveau de souris pour les animaux ayant reçu le véhicule, le 4-HBA, le 3-HBA et le 2-HBA

Les deux isomères de position de 4-HBA ne montrent aucun effet amélioration au niveau de la taille des lésions ischémiques.

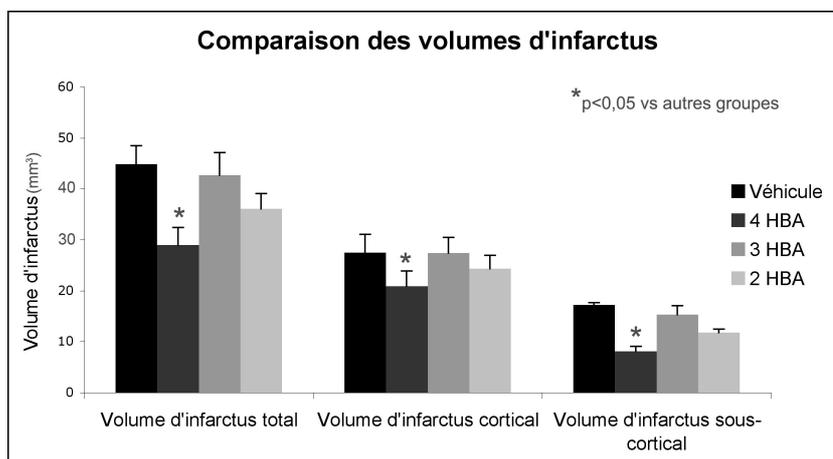


Fig. 41 : Comparaison des volumes d'infarctus totaux, corticaux et sous-corticaux des animaux témoins, et des animaux ayant reçu 4-HBA, 3-HBA et 2-HBA

Les valeurs d'infarctus totaux, corticaux et sous-corticaux pour les différents groupes par rapport aux animaux témoins sont représentées à la figure 41. On n'observe aucune diminution des volumes d'infarctus pour les animaux traités avec le 3-HBA. Une tendance non significative à une diminution des volumes d'infarctus totaux, corticaux et sous-corticaux de 18%, 11% et 20% est mise en évidence pour les animaux traités avec le 3-HBA. Et comme déjà vu dans les autres sections, on observe une diminution significative des volumes d'infarctus totaux, corticaux et sous-corticaux de 35%, 25% et 55% pour les animaux traités par 4-HBA.

Ces molécules isomères de 4-HBA n'ont donc aucun effet neuroprotecteur significatif par rapport au groupe d'animaux témoins dans le modèle d'IRC, en comparaison à l'effet induit par le 4-HBA lui-même.

IV.a.2. Effet anti-œdémateux

Le potentiel anti-œdémateux des isomères de position de 4-HBA a été étudié dans le modèle d'IRC. Les résultats obtenus sont repris à la figure 42.

Comparaison des volumes d'œdème

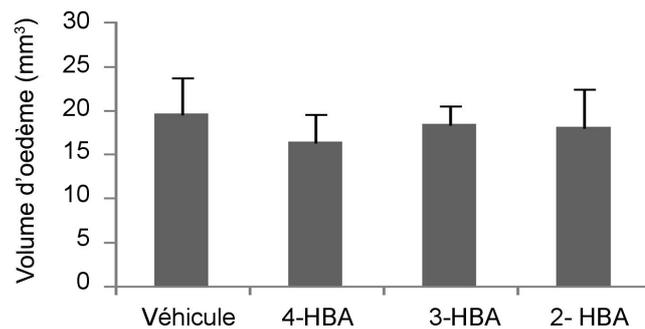


Fig. 42 : Comparaison des volumes d'œdème des animaux témoins et des animaux ayant reçu 4-HBA, 3-HBA ou 2-HBA

On ne remarque aucune modification significative des volumes d'œdèmes, quelle que soit la molécule étudiée (véhicule, 4-HBA, 3-HBA ou 2-HBA). Ce qui indique que ces molécules n'agissent pas dans l'IRC suivant un mécanisme anti-œdémateux.

IV.b. Effet sur PDI

L'effet des différents isomères de position de l'alcool hydroxybenzylique sur l'induction de la PDI a été étudié par western blot.

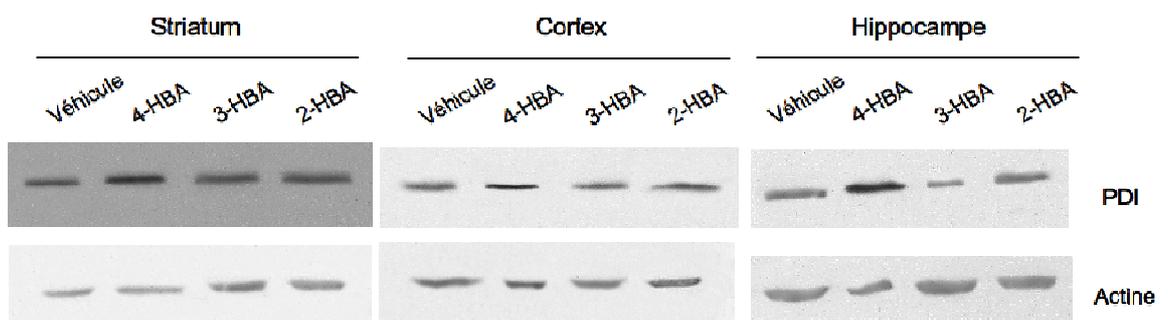


Fig. 43: Effet de l'induction de PDI pour les groupes d'animaux ayant reçu 4-HBA, 3-HBA et 2-HBA en comparaison au groupe témoin par western blot

L'étude du taux de la PDI par western blot ne montre pas d'induction pour les animaux ayant été traités avec le 3-HBA ainsi qu'avec le 2-HBA (Fig. 43). On note une induction de la PDI pour les animaux ayant reçu le 4-HBA.

Les densités optiques de ces gels de western blots ont été mises en graphique (Fig. 44).

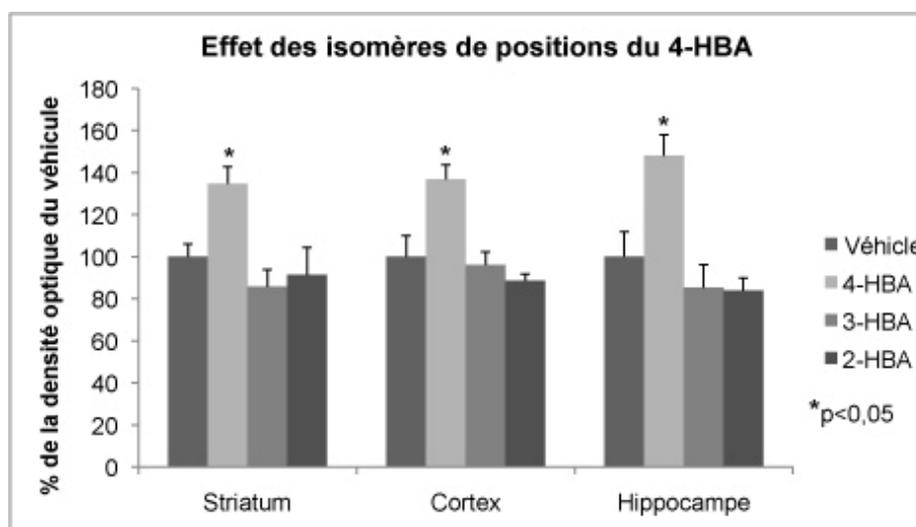


Fig. 44 : Induction de la PDI chez les animaux sains ayant reçu le véhicule, le 4-HBA ; le 3-HBA ou le 2-HBA

On ne note aucune modification significative des niveaux de la PDI pour les groupes 3-HBA et 2-HBA par rapport au groupe témoin même si on remarque une tendance à la diminution du niveau de la protéine. En effet, les niveaux striataux, corticaux et hippocampaux sont diminués, de façon non significative, de respectivement 15%, 4% et 14% pour le groupe 3-HBA et de 9%, 11% et 15% pour le groupe 2-HBA.

Pour le groupe d'animaux ayant été traités avec le 4-HBA, on vérifie une induction de la PDI, avec une augmentation significative des niveaux de la PDI de 35%, 37% et 48% pour les zones striatale, corticale et hippocampale.

V. Etude des analogues linéaires de 4-HBA

Les analogues linéaires du 4-HBA, le 1,4-butanediol (BD) ainsi que le 1,5-pentanediol (PD) 5, ont également été évalués dans notre étude. Tester ces molécules pourra déterminer l'importance structurelle du cycle benzénique dans la neuroprotection observée pour le 4-HBA.

V.a. Ischémie reperfusion cérébrale

V.a.1. Effet protecteur des analogues linéaires

L'étude des analogues linéaires de 4-HBA dans le modèle d'IRC est illustrée à la figure 45. Y sont représentées les coupes d'un cerveau de souris pour les groupes témoin (véhicule), PD et BD.

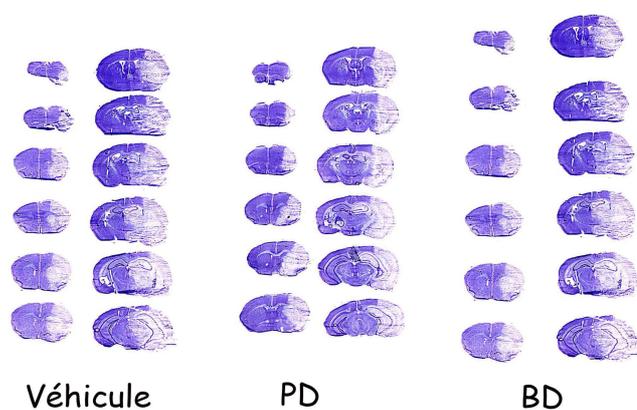


Fig. 45 : Coupes histomorphométriques d'un cerveau de souris pour les animaux ayant reçu le véhicule, le PD et le BD

L'étude des analogues linéaires de 4-HBA dans le modèle d'IRC nous montre que ces deux molécules n'ont aucun effet sur la taille des lésions en comparaison des coupes témoins.

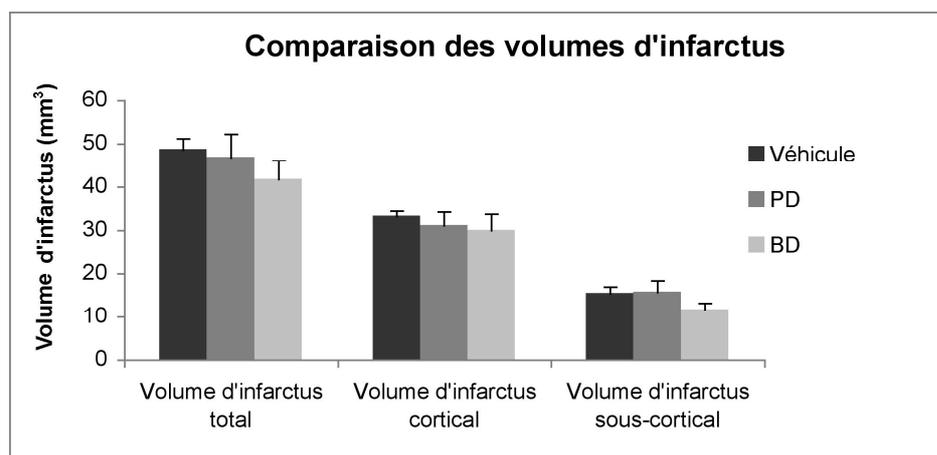


Fig. 46 : Comparaisons des volumes d'infarctus totaux, corticaux et sous-corticaux des animaux témoins, et des animaux ayant reçu le butanediol et le pentanediol

Aucun effet neuroprotecteur significatif par rapport au groupe d'animaux témoins n'est observé, que cela soit pour le groupe d'animaux traité au PD ou celui traité au BD (Fig. 46).

V.a.2. Effet anti-œdémateux

Le potentiel anti-œdémateux des analogues linéaires de 4-HBA a été étudié dans le modèle d'IRC. Les résultats obtenus sont repris à la figure 47.

Comparaison des volumes d'œdème

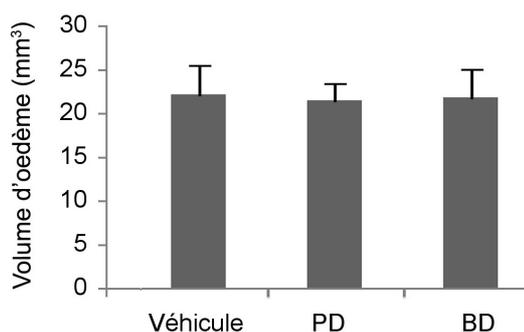


Fig. 47 : Comparaison des volumes d'œdème des animaux témoins et des animaux ayant reçu le PD et le BD

On ne remarque aucune modification significative des volumes d'œdèmes, quelle que soit la molécule étudiée (véhicule, pentanediol ou butanediol). Ce qui nous indique que ces molécules sont dépourvues d'un effet anti-œdémateux.

ARTICLE

Experimental stroke protection induced by
4-hydroxybenzyl alcohol is cancelled by bacitracin

Elodie Descamps, Maud Petrault-Laprais, Pierre Maurois, Nicole Pages,
Pierre Bac, Régis Bordet, Joseph Vamecq

Neuroscience Research, Volume 64, Issue 2, June 2009, Pages 137-142



Experimental stroke protection induced by 4-hydroxybenzyl alcohol is cancelled by bacitracin

Elodie Descamps^a, Maud Petrault-Laprais^a, Pierre Maurois^b, Nicole Pages^{b,c},
Pierre Bac^b, Régis Bordet^a, Joseph Vamecq^{a,d,*}

^a EA 1046, Pharmacology, Faculty of Medicine, Research Branch, IMPRT, University of Lille North of France, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

^b Faculty of Pharmacy, University Paris Sud 11, F-92296 Châtenay-Malabry and CNRS UMR 8162, IFR 13, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, F-92350 Le Plessis Robinson, France

^c Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, F-67401 Illkirch, France

^d Inserm, Pharmacology, Faculty of Medicine, Research Branch, IMPRT, University of Lille North of France, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2008

Received in revised form 5 February 2009

Accepted 10 February 2009

Available online 20 February 2009

Keywords:

Ischemic stroke

4-Hydroxybenzyl alcohol

Bacitracin

Neuroprotection

Protein disulfide isomerase

Middle cerebral artery occlusion

ABSTRACT

Induction of protein disulfide isomerase (PDI) is validated as a main mechanism by which 4-hydroxybenzyl alcohol (4-HBA), an active principle of *Gastrodia elata* Blume, reduces cerebral infarct volumes in a murine model of focal brain ischemia/reperfusion. In contrast to its position isomers, i.e. 3-hydroxybenzyl alcohol (3-HBA) and 2-hydroxybenzyl alcohol (2-HBA), and to aliphatic diols (1,4-butanediol and 1,5-pentanediol), 4-HBA administered intravenously at 25 mg/kg protected mice, significantly reducing total, cortical and sub-cortical infarct volumes by 42, 28 and 55%, respectively. All compounds, 4-HBA included, were devoid of antioedematous properties. Only the stroke protective 4-HBA, but neither 3-HBA nor 2-HBA, was capable of significantly inducing PDI in intact mouse brains. Stroke protection was fully prevented by bacitracin (500 mg/kg), a known inhibitor of PDI, which, without affecting basal brain PDI levels, altered the ability of 4-HBA to induce significantly PDI in intact brains. Taken as a whole, our data indicate that stroke protection induced by 4-HBA involves PDI as a key player, making this protein a valuable target to control brain injury disorders. The fact that 4-HBA, at doses up to 200 mg/kg, was devoid of neurotoxicity in the rotarod test is also a decisive element to promote the neuroprotective use of this plant compound.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

1. Introduction

The majority (approximately 80%) of strokes are ischemic, and involve occlusion of arteries delivering essential nutrients and oxygen to the brain. There are now interventions for acute revascularisation, either pharmacologically or mechanically, and strategies based on developing pathophysiological models of stroke (Blakeley and Llinas, 2007). Major trials have evaluated thrombolytic agents in the treatment of acute ischemic stroke (Blakeley and Llinas, 2007). Beside emergency interventions alleviating cerebral vessel occlusion, general neuroprotective strategies also targeting the so-called penumbra lesions have been developed to limit the extension of the primarily injured core, permitting in practice some delayed intervention. Current and emerging neuroprotective strategies have been reviewed elsewhere (Mehta et al., 2007).

Animal models for the study of ischemic stroke include transient unilateral middle cerebral arterial occlusion (MCAO) which combines an hour of ischemia followed by 24 h of reperfusion (Bastide et al., 1999). In this model, Yu et al. (2005) have shown that preconditioning could be mimicked by 4-hydroxybenzyl alcohol (4-HBA), an inductor of protein disulfide isomerase (PDI) which notably lowers brain cortical infarct volumes. PDI catalyses the isomerisation of protein disulfide bonds (allowing re-arrangement of disulfide bridges within the protein structure), and, depending on the redox state, either oxidation of thiols or reduction of disulfides, assisting chaperones in protein folding and often being considered itself as a chaperone inhibiting protein aggregation (Wilkinson and Gilbert, 2004).

The amount of brain PDI may be increased by cerebral ischemia/reperfusion in rodents (Tanaka et al., 2000). As mentioned above, this increase, when amplified by a preconditioning administration of 4-HBA, is associated with a reduction of cerebral infarct volumes (Yu et al., 2005). Because PDI activity might protect proteins against oxidative damages, conformational changes (for instance, masking strategic sites of the protein during the lapse of time of oxidative injury), the induction of PDI might be a worthy means to

* Corresponding author at: Inserm, EA 1046, Pharmacology, University of Lille 2, Faculty of Medicine, Research Branch, 4th Floor, 1 Place de Verdun, F-59045 Lille Cedex, France. Tel.: +33 3 20 44 54 49; fax: +33 3 20 44 68 63.

E-mail address: joseph.vamecq@inserm.fr (J. Vamecq).

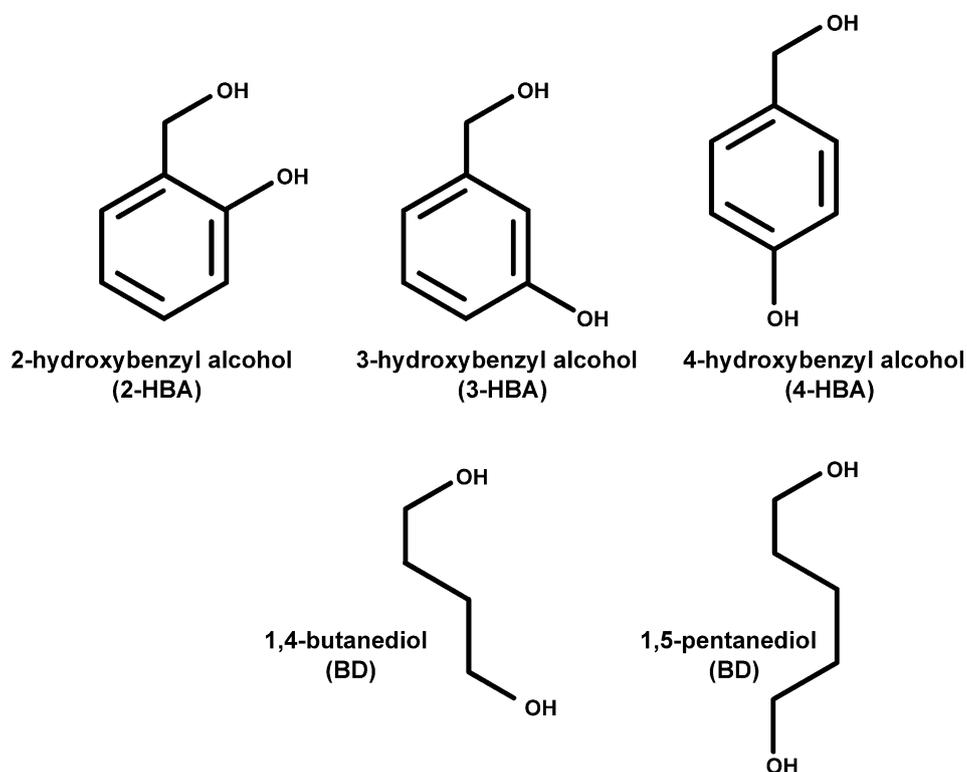


Fig. 1. 4-Hydroxybenzyl alcohol and structural analogues.

limit the extension of so-called penumbra lesions and hence be potentially suitable for either immediate or delayed intervention. Along these lines, the protective role of the PDI inducer 4-HBA was here studied in the MCAO model independently of any preconditioning protocol. Because many potentially protective (antioxidant, anti-excitotoxic, pro-PDI and GABAergic modulatory) activities are conveyed by 4-HBA (Kim et al., 2007; Yu et al., 2005; Liu and Mori, 1993), the accurate contribution of PDI to effects of 4-HBA on brain infarct volumes (and audiogenic seizure susceptibility) was assessed by inhibition experiments using bacitracin. Modulation of brain infarct volumes by several analogues of 4-HBA was also determined. These analogues were designed taking into account that 4-HBA is a diol aromatic compound combining phenol and a methylene unit substituted with an alcohol. Designed analogues included aromatic isomers represented by 2-hydroxybenzyl alcohol (2-HBA) and 3-hydroxybenzyl alcohol (3-HBA) and two aliphatic diol compounds, 1,4-butanediol (BD) and 1,5-pentanediol (PD) (Fig. 1). Compared to 4-HBA, the former two compounds were chosen in order to obtain a distinct pattern of the respective positioning of the two alcohol functions around the benzene ring; the latter two compounds were chosen to maintain the diol pattern but not the aromatic ring in their chemical formula. Compounds and vehicle were evaluated in the MCAO model as indicated in Fig. 2 and as mentioned above, independently of any preconditioning protocol.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

4-HBA, 3-HBA, 2-HBA, BD, PD and bacitracin were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Mouse anti-PDI monoclonal antibody (SPA-891) was obtained from Assay Designs (Ann Arbor MI, USA).

2.2. Animals

C57 black J6 mice (28–30 g) were used (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Mice were housed six per cage, in an alternating 12:12 light/dark cycle with lights on at 07:00. All procedures involving animals and their care were performed in

agreement with the local ethical committee for animal experimentation and in compliance with our institutional guidelines, which comply with current national and international laws and recommendations.

2.3. MCAO model

Anaesthesia was induced in mice by chloral hydrate administered via the intraperitoneal route at a dose of 300 mg/kg. The ostium of the right middle cerebral artery (MCA) was occluded intraluminally as described previously (Bastide et al., 1999). The right carotid arteries were exposed through a midline cervical incision and the common carotid and external carotid arteries were ligated with a silk suture. Aneurysm clip was placed across the internal carotid artery and an arteriotomy was made in the common carotid artery stump allowing the introduction of a 6/0 nylon suture monofilament with its tip rounded by flame heating. This was secured in place and the aneurysm clip on the internal carotid artery was removed. The suture was gently advanced into the internal carotid artery and passed into the intracranial circulation to lodge in the narrower lumen of the origin of the MCA. Mild resistance to this advancement indicated that the intraluminal occluder had entered the anterior cerebral artery and had been then placed beyond the ostium of MCA, ensuring obstruction of the latter. After 60 min, the monofilament was carefully removed, until its tip was blocked by ligature placed on common carotid artery, to permit reperfusion. The caudal artery catheter was removed and the artery was ligated to prevent bleeding. The animals were placed for 24 h in cage to recover from anaesthesia at room temperature and were allowed to eat and drink freely.

2.4. Administration of compounds in the MCAO model

Individual and combined administrations of compounds in the MCAO model were performed according to protocols appearing in Fig. 2 introduced above and commented in the figure legend.

2.5. Histology

Mice were sacrificed by the overdose of pentobarbital injected intraperitoneally 24 h after reperfusion. Brains were rapidly removed, frozen and coronally sectioned into 20- μ m thick slices on a cryostat at 12 levels separated by 1-mm intervals according to stereotaxic section maps (Paxinos and Watson, 1986). Sections were stained with cresyl fast violet. The unstained area of the brain sections was defined as the infarct. Cortical and sub-cortical areas and total hemispheric areas of infarcts were calculated separately for each coronal slice by image analysis software (Color Image 1.32, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) after digitisation by a scanner process. Total, cortical, sub-cortical infarct volumes,

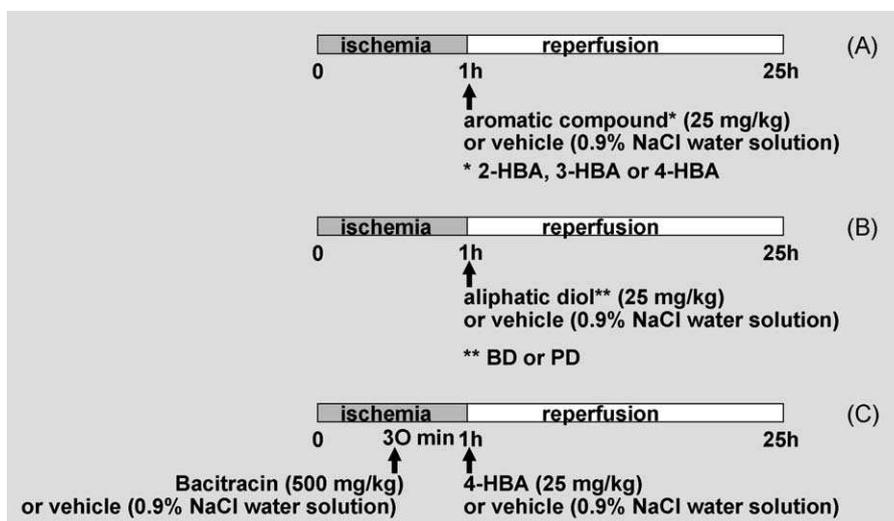


Fig. 2. Experimental protocols for compound administration and evaluation of stroke protection in the MCAO model. Individual (A and B) and combined (C) administrations of compounds resulted in three series of experiments including 4, 3 and 4 groups of animals, respectively. For protocol A, each of the three aromatic compounds at doses indicated or vehicle were administered individually *via* the intravenous route in a final volume of 10 $\mu\text{L/g}$ mouse body weight. For protocol B, protocol A was applied to aliphatic diols using new reference vehicle administration. For protocol C, the animals were randomly distributed into four groups: the control, the 4-HBA, the bacitracin and the bacitracin plus 4-HBA groups. In the control group, vehicle (0.9% saline solution) was administered half an hour after the onset of ischemia *via* the intra-muscular route and 1 h after starting ischemia, i.e. at reperfusion, *via* the intravenous route. In the 4-HBA group, vehicle was administered intramuscularly half an hour after the beginning of ischemia and 4-HBA was administered intravenously at reperfusion. In the bacitracin group, bacitracin was administered intra-muscularly half an hour after ischemia onset and the vehicle was given intravenously at reperfusion. The bacitracin + 4-HBA group combined intra-muscular administration of bacitracin half an hour after ischemia onset and 4-HBA intravenous administration at reperfusion. Sacrifice of the animals was performed at the 25 h time point as indicated in the Materials and methods section.

and hemispheric volumes (in mm^3) were calculated using numerical integration of the respective areas for all of the sections and the distance between them. A corrected total infarct volume was calculated to compensate for the effect of brain oedema (Lin et al., 1993). The corrected volume was calculated using the following equation:

$$\text{corrected infarct volume} = \text{total infarct volume} \times \frac{\text{left hemisphere volume}}{\text{right hemisphere volume}}$$

The corrected infarct volume served as an index of brain injury level.

The oedema volumes were determined by the difference between right and left hemisphere volumes.

2.6. Western blots

The expression level of PDI was determined by Western blot analysis. Approximately 100 μg of proteins was boiled in a Laemmli buffer plus 5% β -mercapto-ethanol mixture for 5 min at 95 $^{\circ}\text{C}$ before electrophoresis on a 10% SDS-polyacrylamide gel.

The protein samples as well as prestained protein molecular weight markers (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) were loaded into each gel's lane before migration of proteins during 90 min at 180 V. Gels were transferred to Hybond-enhanced chemiluminescence (ECL) nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) for 45 min at 100 V. Blots were then soaked in 5% skimmed milk for 30 min at room temperature. PDI was probed with a mouse anti-PDI monoclonal antibody (1:500, SPA-891, Assay Designs, Ann Arbor MI, USA) as a primary antibody, and a peroxidase anti-mouse antibody (1:50,000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) as a secondary antibody. After washing the blots with PBS buffer (phosphate buffered saline), PDI-specific bands were soaked by ECL Western blot detection reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and then revealed on high performance chemiluminescence film (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). To determine the protein expression level, the relevant band intensity appearing on the film was quantified, after a scanner-driven capture, by optical density using Adobe Photoshop 7.0 software.

2.7. Minimal acute neurotoxicity

Minimal acute neurotoxicity was determined in adult mice by the rotarod test (Vamecq et al., 2003) in treated and untreated animals 24 h after the tested compound or the vehicle was administered in combination with the anaesthetic drug. The mouse was placed on a 1 in. diameter knurled plastic rod rotating at 6 rpm. Normally, unimpaired mice can easily remain on a rod rotating at this speed. Minimal acute neurotoxicity refers to neurological deficit (e.g. ataxia, sedation, and hyperexcitability) indicated by the inability of the animal to maintain equilibrium on the rod for at least 1 min, in each of three concurrent trials.

2.8. Statistical analysis

Data are expressed as the means \pm S.E.M. They were compared with a one-way analysis of variance (ANOVA), post hoc LSD, using SPSS (13.00 Version; LEAD Technologies, Chicago, IL). Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Evaluation of 4-HBA and isomers in the MCAO model

4-HBA and its isomers (3-HBA and 2-HBA) were evaluated in the MCAO model (60 min cerebral ischemia followed by 24 h reperfusion) to determine which molecule had the best neuro-protective effect. The best protection was observed for the 4-HBA-treated animals group. In this group, total ($24.89 \pm 2.94 \text{ mm}^3$), cortical ($18.33 \pm 2.09 \text{ mm}^3$) and sub-cortical ($7.54 \pm 0.98 \text{ mm}^3$) infarct volumes were significantly decreased in comparison to control values (total infarct volume = $42.67 \pm 3.67 \text{ mm}^3$, cortical infarct volume = $25.50 \pm 3.48 \text{ mm}^3$, sub-cortical infarct volume = $17.17 \pm 0.41 \text{ mm}^3$) with $p < 0.05$ (Fig. 3A). However, no significant changes in total, cortical and sub-cortical infarct volumes were observed after either 2-HBA or 3-HBA treatment as compared to the control values, with nevertheless some tendency towards a reduction of brain infarct volumes for 2-HBA.

3.2. Evaluation of aliphatic diols in the MCAO model

Evaluations of aliphatic diols against stroke failed to point out significant changes in total infarct volume, cortical infarct volume and sub-cortical infarct volume after either BD or PD treatment as compared to control group values (Fig. 3B).

3.3. Evaluation of the PDI contribution to the protection given by 4-HBA in the MCAO model

To determine whether or not PDI induction took place in the mechanisms leading to brain protection by 4-HBA, two additional sets of experiments were performed. In the first one, the effect of

the PDI inhibitor bacitracin (Mandel et al., 1993) on the protection caused by 4-HBA was studied to determine the PDI dependency of the 4-HBA-induced protection. In the second additional set of experiments, the abilities of active 4-HBA and inactive 2-HBA and 3-HBA to induce PDI in cortical and sub-cortical areas of intact brain were compared in order to establish whether or not a parallelism could exist between brain PDI inductive and brain protective properties of compounds.

3.3.1. Effect of bacitracin on 4-HBA neuroprotection

Bacitracin was tested in the cerebral ischemia reperfusion model. Four (control, 4-HBA, bacitracin and bacitracin + 4-HBA) groups were randomised as described in the Materials and methods section and in Fig. 2. The experiments performed on these groups reproduced the significant decrease of infarct volumes (total, cortical and sub-cortical) for the 4-HBA treated animals (total infarct volume = $34.16 \pm 2.62 \text{ mm}^3$, cortical infarct volume = $24.98 \pm 2.22 \text{ mm}^3$, sub-cortical infarct volume = $9.19 \pm 0.93 \text{ mm}^3$) as compared to the control group (total infarct volume = $45.09 \pm 1.72 \text{ mm}^3$, cortical infarct volume = $32.05 \pm 1.96 \text{ mm}^3$, sub-cortical infarct volume = $13.04 \pm 0.93 \text{ mm}^3$) with $p < 0.05$ (Fig. 4A). Bacitracin alone did not significantly modify infarct volume sizes when compared to the control group. Brain infarct volumes in the bacitracin + 4-HBA group were not significantly distinct from control values, indicating that administration of bacitracin fully prevented the neuroprotection given by 4-HBA in the MCAO model.

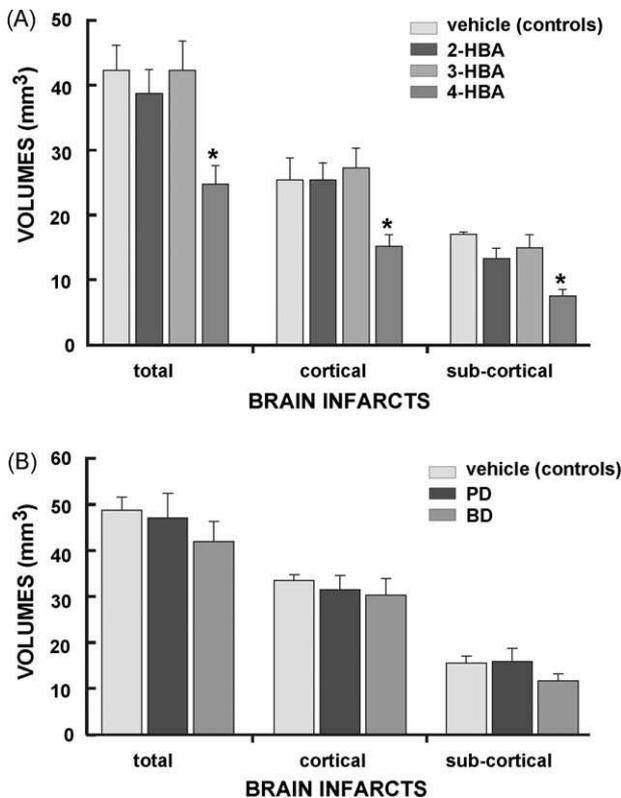


Fig. 3. Effect of compounds on brain infarct volumes (total, cortical and sub-cortical infarcts) induced in mice by 60 min cerebral ischemia followed by 24 h reperfusion. (Panel A) Hydroxybenzyl alcohol isomers (4-HBA, 3-HBA, 2-HBA) (Protocol A experiments) At reperfusion, 25 mg/kg 4-HBA, 3-HBA or 2-HBA were given intravenously to the animals, controls referring to the intravenous administration of the vehicle alone (i.e. 0.9% saline solution). Infarct volumes were corrected for oedema as indicated in the Materials and methods section. Values are mean \pm S.E.M. ($n = 6$). * $p < 0.05$. (Panel B) 1,5-Pentanediol (PD) and 1,4-butanediol (BD) (Protocol B experiments). 25 mg/kg aliphatic diols were given by iv route at reperfusion (PD and BD groups), the control group receiving the vehicle alone (0.9% saline solution). Infarct volumes were corrected for oedema. Values are mean \pm S.E.M. ($n = 6$).

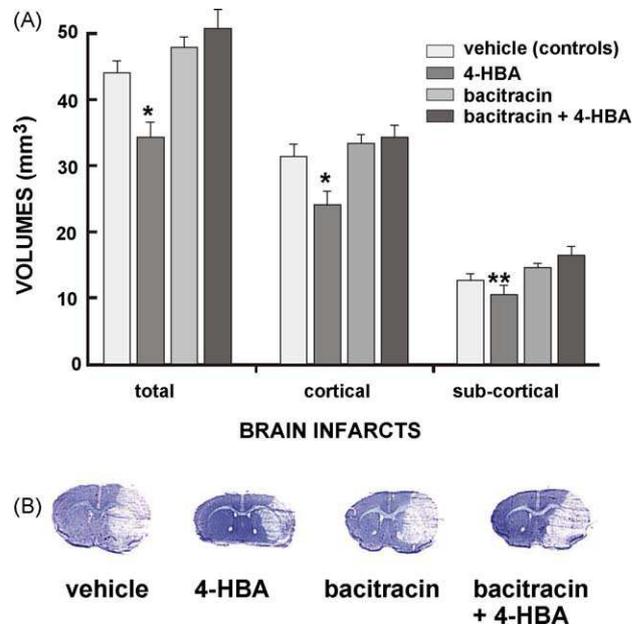


Fig. 4. Effect of 4-hydroxybenzyl alcohol (4-HBA) and bacitracin on infarct volumes (total, cortical and sub-cortical infarcts) induced by 60 min cerebral ischemia followed by 24 h reperfusion (Protocol C experiments) (Panel A) 4-HBA 25 mg/kg ($n = 7$) was given by intravenous injection at reperfusion; and bacitracin 500 mg/kg ($n = 8$) by intramuscular injection half an hour before reperfusion. For the bacitracin + 4-HBA group ($n = 7$), these administrations were combined using the same doses and the same administration route for each compound. Infarct volumes were corrected for oedema. Values are mean \pm S.E.M. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$. (Panel B) Coronal sections corresponding to equivalent slices of brains from one animal in each experimental group are compared. Unstained tissue refers to the brain infarct.

Fig. 4B well visualises the protection provided by 4-HBA against experimental stroke and its alleviation by bacitracin through a comparison of coronal sections performed at the same brain level in each experimental condition.

3.3.2. Effect of 4-HBA on intact brain PDI

The amount of PDI in brain cortical and sub-cortical areas was studied by Western blot analysis of tissue homogenates from animals sacrificed 24 h after intravenous administration of vehicle and/or 25 mg/kg 2-, 3- or 4-HBA (Fig. 5A and B). PDI was detected in each studied area of intact brains from animals receiving the intravenous injection of the saline vehicle. A significant 20–25% increase was noticed in both cortical and sub-cortical areas of intact brains when 4-HBA was administered 24 h before animal sacrifice (Fig. 5), a result validating PDI inductive properties of 4-HBA. In these conditions, neither 2-HBA nor 3-HBA significantly induced brain PDI (Fig. 5).

3.4. Miscellaneous

In order to settle whether anti-oedema mechanisms might take place in the protection given by 4-HBA, the effects of compounds on cerebral oedema have been compared (Fig. 6) in the stroke model. In our hands, none of the compounds, 4-HBA included, were able to lower significantly oedema volumes in the injured hemisphere.

Behaviour of mice in the rotarod procedure indicated that 4-HBA (given intravenously in a 0.9% saline solution) administered 1 h after intraperitoneal injection of 300 mg/kg chloral hydrate and 24 h before testing (conditions in which 25 mg/kg 4-HBA was evaluated in the stroke model) did not cause toxicity at doses up to 200 mg/kg. Administration of higher doses of 4-HBA was precluded by difficulties in obtaining homogenous stock

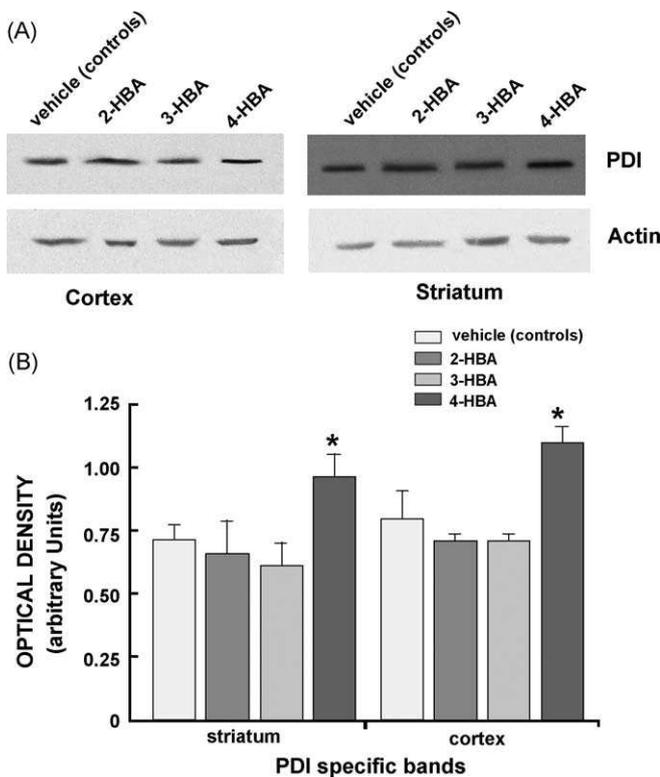


Fig. 5. Induction of brain PDI by 4-HBA and not by 2-HBA and 3-HBA is shown by Western blot analysis of PDI expression in cortex and striatum from non-ischemic mice (Panel A) gel bands obtained for animals treated with the vehicle and/or 2-HBA, 3-HBA or 4-HBA (in each experiment, proteins were collected from each cerebral hemisphere). (Panel B) optic densities obtained by image acquisition of gel bands using similar scanner assisted conditions and Photoshop 7.0 software in each experimental condition. Each histogram represents the mean value (\pm S.E.M.) of 10–12 optical density measurements (one optical density measurement corresponding to one gel band). Each PDI band optical density was weighted (i.e. divided) by the matched actin band optical density to determine the ordinate values. * $p < 0.05$.

saline solutions compatible with an injected volume of less than 0.5 mL.

The effect of bacitracin on the ability of 4-HBA to induce PDI in intact mouse brains was also explored (Fig. 7). In contrast to the group of animals given 4-HBA and the saline vehicle, the group of animals administered both *iv* 4-HBA and *im* bacitracin did not significantly distinguish from the control group of animals (receiving the saline vehicle via both the *iv* and *im* routes). This set of experiments suggested that bacitracin altered the ability of 4-HBA to induce significantly PDI in intact brains.

4. Discussion

4-HBA is the active principle of *Gastrodia elata* Blume, a herb used in traditional Chinese medicine to treat various neurological disorders among others. It has been shown to possess several molecular actions including GABAergic modulatory, antioxidant, anti-excitotoxic and PDI induction properties (Kim et al., 2007; Yu et al., 2005; Liu and Mori, 1993). Each of these properties theoretically represents protective mechanisms. However, the main mechanism of 4-HBA-mediated protection against stroke has not been determined, yet.

The neuroprotective impact of 4-HBA was here studied in a cerebral ischemia reperfusion model in which it was administered once at the moment of reperfusion. 4-HBA induced a level of neuroprotection of more than 30% for total and sub-cortical infarct volumes. Infarct volumes were calculated using a

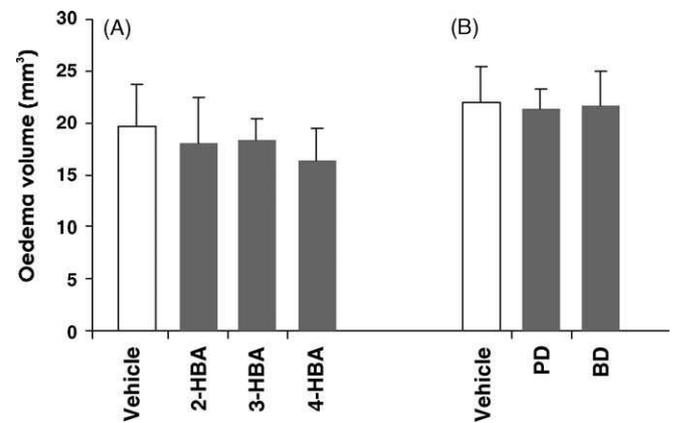


Fig. 6. Effects of 4-HBA and related compounds on brain oedema volumes in the injured cerebral hemisphere undergoing 1 h MCAO followed by 24 h reperfusion. Data on panels A and B were acquired on the same injured hemispheres as those for which infarct volume data appear in Fig. 3 panels A and B, respectively. Other comments are in the text.

method in which the oedema was considered to be located only in the ischemia's area. This method allowing the oedema to be subtracted when expressing cortical and sub-cortical infarct volume values, our data on brain lesions were not biased by the oedema. In this respect, it may be underlined that, in fact, oedema sizes were not influenced by 4-HBA; ruling out that

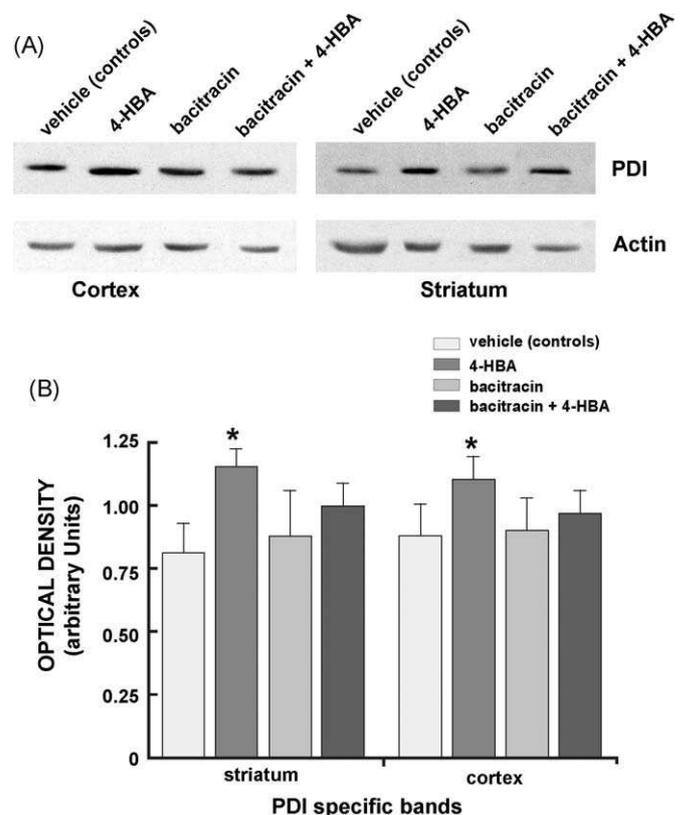


Fig. 7. Effect of bacitracin on the ability of 4-HBA to induce PDI in intact mouse brains (Panel A) gel bands obtained for animals treated with the vehicle and/or 4-HBA, bacitracine or 4-HBA plus bacitracin (in each experiment, proteins were collected from each cerebral hemisphere). (Panel B) optical densities obtained by image acquisition of gel bands using similar scanner assisted conditions and Photoshop 7.0 software in each experimental condition. Each histogram represents the mean value (\pm S.E.M.) of 6 optical density measurements (one optical density measurement corresponding to one gel band). Each PDI band optical density was weighted (i.e. divided) by the matched actin band optical density to determine the ordinate values. * $p < 0.05$.

protection could be accounted for by anti-oedematous properties. In our work, the neuroprotective properties of 4-HBA were observed outside a preconditioning protocol in contrast to the work of Yu et al. (2005) who administered the treatment during 3 days prior to performing 1 h MCAO followed by 24 h reperfusion.

A comparison of neuroprotective efficiencies of 4-HBA and its isomers points out the importance for the active compound of the electron delocalisation potentialities allowed by the 1,4 disubstitution pattern of the benzyl ring. Interestingly, this structural requirement is evocative of 1,4-benzenediol (i.e. hydroquinone), a potent activator of the antioxidant responsive element (ARE) (Rushmore et al., 1991). In this respect, ARE sequences are found in the promoter areas of the PDI gene (Tasanen et al., 1992) and also other genes (Lyakhovich et al., 2006), explaining why ARE activation up-regulates a variety of proteins.

The ability of the PDI inhibitor bacitracin to cancel the neuroprotective effect of 4-HBA provides a direct experimental support for a major involvement of PDI in experimental stroke protection. The PDI induction by 4-HBA given to control mice was studied on both cortical and sub-cortical areas from intact non-ischemic brains by western blot analysis. The PDI amount was increased by 4-HBA in these two brain areas, suggesting that 4-HBA is likely to cross the blood-brain barrier. It is also noteworthy that injured brain area protection and intact brain PDI induction patterns coincided. Indeed, from the one hand 4-HBA and on the other hand 2-HBA and 3-HBA were able and unable to activate PDI expression in intact brain, and were active and inactive to lower brain infarct volumes, respectively.

Bacitracin has often been used to determine the involvement of PDI in different pathways such as platelet activation (O'Neill et al., 2000) and NF- κ B-dependent transcriptional events (Higuchi et al., 2004). To study whether or not 4-HBA-induced neuroprotection could be accounted for by PDI, bacitracin was co-administered with 4-HBA. Bacitracin was previously shown to inhibit the isomerase activity of PDI (O'Neill et al., 2000) and also its reductive and oxidative functions (Ryser et al., 1994) through direct compound/protein interactions. Our data indicate that bacitracin, though not affecting basal rates of PDI in intact brains, may alter the ability of 4-HBA to induce significantly PDI in intact brains, a previously overlooked feature which may also contribute to the cancellation by the antibiotic of the 4-HBA-driven increase in PDI function and hence of the brain protection. A breakthrough of the present work is the experimental evidence that PDI might be a key target to control brain injury disorders. Taking into account that, as mentioned above, PDI acts as or assists molecular chaperones, our conclusion also falls in the scope of recent developments emphasising the neuroprotective role of chaperones in various models of brain disorders (Calabrese et al., 2005; Giffard et al., 2004; Ohtsuka and Suzuki, 2000).

Acknowledgment

ED was sponsored by the "Groupe Lillois de Recherche en Pathologie Vasculaire - GLRPV".

References

- Bastide, M., Bordet, R., Pu, Q., Robin, E., Puisieux, F., Dupuis, B., 1999. Relationship between inward rectifier potassium current impairment and brain injury after cerebral ischemia/reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 1309–1315.
- Blakeley, J.O., Llinas, R.H., 2007. Thrombolytic therapy for acute ischemic stroke. *J. Neurol. Sci.* 61, 55–62.
- Calabrese, V., Lodi, R., Tonon, C., D'Agata, V., Sapienza, M., Scapagnini, G., Mangiameli, A., Pennisi, G., Stella, A.M., Butterfield, D.A., 2005. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J. Neurol. Sci.* 233, 145–162.
- Giffard, R.G., Xu, L., Zhao, H., Carrico, W., Ouyang, Y., Qiao, Y., Sapolsky, R., Steinberg, G., Hu, B., Yenari, M.A., 2004. Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J. Exp. Biol.* 207, 3213–3220.
- Higuchi, T., Watanabe, Y., Woga, I., 2004. Protein disulfide isomerase suppresses the transcriptional activity of NF- κ B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 46–52.
- Kim, H., Hwang, I., Win, M., 2007. Vanillin, 4-hydroxybenzyl aldehyde and 4-hydroxybenzyl alcohol prevent hippocampal CA1 cell death following global ischemia. *Brain Res.* 1181, 130–141.
- Lin, T.N., He, Y.Y., Wu, G., Khan, M., Hsu, C.Y., 1993. Effects of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke* 24, 117–121.
- Liu, J., Mori, A., 1993. Antioxidant and pro-oxidant activities of *p*-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, aminoacids and DNA. *Neuropharmacology* 32, 659–669.
- Lyakhovich, V.V., Vavilin, V.A., Zenkov, N.K., Menshchikova, E.B., 2006. Active defense under stress. The antioxidant responsive element. *Biochemistry* 71, 962–974.
- Mandel, E., Ryser, H., Ghani, F., Wu, M., Peak, D., 1993. Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 4112–4116.
- Mehta, S.L., Manhas, N., Raghurir, R., 2007. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res. Rev.* 54, 34–66.
- Ohtsuka, K., Suzuki, T., 2000. Roles of molecular chaperones in the nervous system. *Brain Res. Bull.* 53, 141–146.
- O'Neill, S., Robinson, A., Deering, A., Ryan, M., Fitzgerald, D.J., Moran, N., 2000. The platelet integrin α 11b β 3 has an endogenous thiol isomerase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 36984–36990.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London.
- Rushmore, T., Morton, M., Pickett, C., 1991. The antioxidant responsive element: activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* 226, 11632–11639.
- Ryser, H., Levy, E., Mandel, R., DiSciullo, G., 1994. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol–disulfide interchange upon virus–receptor interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 4559–4563.
- Tanaka, S., Uehara, T., Nomura, Y., 2000. Up-regulation of protein disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* 275, 10388–10393.
- Tasanen, K., Oikarinen, J., Kivirikko, K., Pihlajaniemi, T., 1992. Promoter of the gene for the multifunctional protein disulfide isomerase polypeptide. *J. Biol. Chem.* 267, 11513–11519.
- Vamecq, J., Maurois, P., Bac, P., Bailly, F., Bernier, J.L., Stables, J.P., Husson, I., Gressens, P., 2003. Potent mammalian cerebroprotection and neuronal cell death inhibition are afforded by a synthetic antioxidant analogue of marine invertebrate cell protectant othothols. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1110–1120.
- Wilkinson, B., Gilbert, H.F., 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1699, 35–44.
- Yu, S., Kim, J., Han, J., Lee, J., Kim, H., Hong, J., Kang, S., 2005. *Gastrodia Elata* Blume and an active component, *p*-hydroxybenzyl alcohol reduce focal ischemic brain injury through antioxidant related gene expressions. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1016–1020.

DISCUSSION

Les traitements neuroprotecteurs actuels étant relativement peu convaincants dans la prise en charge des AVC, il était intéressant de rechercher de nouvelles cibles pharmacologiques. Le projet Neuronox a mené à la mise en évidence de la PDI comme cible d'intérêt dans l'IRC.

Une étude publiée en 2005 (Yu *et al.*, 2005) mettait en évidence l'effet neuroprotecteur d'un inducteur de la PDI, le 4-HBA, administré en préconditionnement 3 jours avant l'ischémie. Dans ce travail, Yu suggérait que l'effet neuroprotecteur apporté par cette molécule pouvait être relié à ses effets antioxydants et piègeurs de radicaux libres, mais sans en connaître le mécanisme sous-jacent. L'implication de cette protéine dans l'IRC avait déjà été montrée en 2000 par les travaux de Tanaka. En plus de son potentiel inducteur de la PDI, 4-HBA montre diverses autres facultés comme une activité modulateur GABAergique ainsi que des propriétés antioxydantes et anti-excitotoxiques (Kim *et al.*, 2007 ; Yu *et al.*, 2005 ; Liu et Mori, 1993). Cependant, le mécanisme principal de la protection contre les attaques cérébrales médiée par le 4-HBA n'a pas encore été déterminé.

Comme 4-HBA montre ces différents mécanismes moléculaires, et que chacun représente théoriquement un mécanisme potentiellement neuroprotecteur, il était important de déterminer si l'induction de PDI était bien le mécanisme mis en jeu dans l'effet de neuroprotection de 4-HBA.

Lors de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'activité du 4-HBA lors de l'ischémie reperfusion cérébrale, ainsi que sur ses propriétés dans l'induction de la PDI. Si la PDI voit son expression induite par le 4-HBA, elle se voit aussi inhibée par la bacitracine, cette dernière molécule a donc aussi fait l'objet d'une étude en vue de tenter de corrélérer l'effet neuroprotecteur et l'induction de la PDI.

Toutes ces démarches ont été réalisées dans le but d'améliorer la compréhension des mécanismes par lesquels la PDI apporte une neuroprotection dans le phénomène d'IRC.

I. Analyses des résultats

I.a. L'induction de la PDI impliquée dans la neuroprotection par 4-HBA

Dans l'ischémie reperfusion cérébrale, nous avons montré que le 4-HBA, administré au moment de la reperfusion, apportait un effet neuroprotecteur significatif dans les différentes zones cérébrales, que ça soit au niveau cortical ou sous-cortical (*Fig. 22*). On observait alors une diminution significative des volumes d'infarctus.

De plus, l'implication de 4-HBA dans l'induction de la PDI dans les zones corticales, sous-corticales et hippocampales a été mise en évidence par western blot sur souris ischémiées et sur souris contrôles (non ischémiées) (*Fig. 25*). On notait bien une augmentation croissante du niveau de la PDI après 6, 15 et 24 heures à tous les niveaux du cerveau (*Fig. 26*).

Le fait que la PDI soit induite dans le cerveau en dehors des conditions d'ischémie, et donc à un moment où l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique est préservée suggère que 4-HBA puisse probablement traverser cette barrière hémato-encéphalique.

Tanaka avait montré une augmentation de la PDI lors de l'IRC seulement au niveau du cortex alors que nous montrons cette augmentation à tous les niveaux du cerveau. Cela pourrait être expliqué par la différence du temps d'occlusion (15 minutes pour Tanaka contre une heure dans notre travail), la PDI n'aurait pas eu le temps d'être induite dans toutes les zones cérébrales en 15 minutes.

Par ces expérimentations, nous pouvions donc établir une corrélation entre la neuroprotection induite par 4-HBA dans l'IRC et l'induction de la PDI dans le cerveau, puisque les zones cérébrales protégées et celles où la PDI est induite coïncident.

La bacitracine a souvent été utilisée pour déterminer l'implication de la PDI dans différentes voies comme l'activation plaquettaire (O'Neill *et al.*, 2000) et les événements transcriptionnels dépendant de NF- κ B (Higuchi *et al.*, 2004). Précédemment, la bacitracine avait montré des capacités inhibitrices de l'activité

isomérase de la PDI (O'Neill *et al.*, 2000) ainsi que de ses activités réductrice et oxydante (Ryser *et al.*, 1994) à travers des interactions composé/protéine.

Pour étudier si la neuroprotection induite par 4-HBA peut être justifiée par PDI, la bacitracine avait été co-administrée avec 4-HBA. L'effet protecteur de 4-HBA était aboli par la co-administration de la bacitracine avec le 4-HBA (*Fig. 36*). La bacitracine seule n'avait aucun effet sur la taille des lésions ischémiques (*Fig. 36*).

De plus, bien que la bacitracine n'affecte pas les taux basiques de la PDI dans le cerveau intact, nos données indiquent que la bacitracine puisse altérer la capacité de 4-HBA à induire significativement la PDI dans le cerveau intact.

Par ces expériences sur la capacité de la bacitracine à supprimer l'effet neuroprotecteur de 4-HBA, nous montrons que l'effet du 4-HBA passe par un mécanisme impliquant l'induction de la PDI.

1.b. Potentiel anti-œdémateux de PDI

La plupart des voies biologiques qui mènent à l'œdème sont communes avec 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. Les effets de neuroprotection observés dans l'IRC peuvent parfois être attribuables à un effet anti-œdémateux de la molécule étudiée.

Nous avons alors évoqué la possibilité que la neuroprotection via l'induction de PDI puisse se dérouler suivant un mécanisme anti-œdémateux. Une étude sur les capacités anti-œdémateuses de 4-HBA ainsi que de la bacitracine a été réalisée.

Il s'est avéré qu'aucune molécule ne possédait d'effet de type anti-œdémateux dans notre modèle d'IRC (*Fig. 23 et 37*). Une action anti-œdémateuse ne peut donc pas justifier la neuroprotection induite par PDI. Ce mécanisme a donc été délaissé, évoquant le fait que la neuroprotection de PDI utilise un autre processus d'action.

I.c. Neurotoxicité de 4-HBA

Les données concernant la toxicité du 4-HBA dans la littérature ne sont pas nombreuses. Dans ces différentes études, le 4-HBA montrait une toxicité moindre que celle des molécules de référence des différents modèles étudiés (Riley *et al.*, 1997; Holdway *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1994), mais à notre connaissance aucune approche de la neurotoxicité de cette molécule n'avait été réalisée. Il était pourtant important de mesurer l'effet neurotoxique de 4-HBA en vue de déterminer si son utilisation dans le cadre de la protection cérébrale ne risquait pas d'aggraver l'état neurologique et moteur de l'animal. En effet, une molécule utilisée dans le cadre de la neuroprotection ne doit pas être toxique.

Le déficit neurologique (ataxie, sédation, hyperexcitabilité) ainsi que le déficit moteur induit par 4-HBA ont été évalués par l'intermédiaire du test de la barre tournante. La dose minimale moyenne neurotoxique (TD₅₀) du 4-HBA est supérieure à 200 mg/kg (*Fig. 27 et 28*), alors que nous avons montré que les doses actives de 4-HBA se trouvent dans la gamme de 25 mg/kg au niveau de ses propriétés antioxydantes mais aussi et surtout neuroprotectrices.

Le 4-HBA n'est donc pas toxique aux concentrations utilisées dans notre étude et peut dès lors être envisagé comme molécule thérapeutique neuroprotectrice dans le cadre de l'IRC.

I.d. 4-HBA dans le modèle de crises audiogènes

Le modèle crises audiogènes dépendante d'une déficience en magnésium représente un test sensible aux basses concentrations des composés anticonvulsivants. De plus, ce test permet d'évaluer les effets neurotoxiques ou neuroprotecteurs des différents traitements. La pertinence de ce modèle dans l'évaluation des composés neuroprotecteurs a été mise en évidence par Bac *et al.* (1998).

La 6-HFN est une molécule antioxydante (Herath W *et al.*, 2008) reconnue pour être active dans le modèle des crises audiogènes. Lors des tests, il s'est avéré agir à une ED₅₀ de 34mg/kg (ED₅₀ = dose protégeant 50% des animaux lors des

crises). Le 4-HBA a été comparé à cette molécule de référence et s'est montré plus actif, l'ED₅₀ étant de 25 mg/kg.

On note que le 4-HBA est actif à des concentrations moins élevées que la 6-HFN. Ces expériences montrent que le 4-HBA possède un potentiel neuroprotecteur dans le modèle des crises audiogènes. Cette molécule possède donc un effet de protection cérébrale dans des conditions lésionnelles autres que celles de l'IRC, ce qui le rend d'autant plus intéressant comme molécule thérapeutique potentielle. Son mécanisme d'action dans ce modèle pourrait dépendre de l'induction de PDI ou seulement de son potentiel antioxydant (comme c'est le cas pour le 6-HFN). Pour vérifier si le mécanisme d'action passe par l'induction de la PDI dans ce modèle de crises audiogènes, il aurait été intéressant d'évaluer la bacitracine, mais cette partie du travail n'a pas été abordée ici.

I.e. Structure chimique requise dans l'effet neuroprotecteur et dans l'induction de la PDI

Une « meilleure » neuroprotection ne peut-elle être induite en modifiant le groupement hydroxyle de position ou en linéarisant la molécule ? Dans ce but, les isomères de positions du 4-HBA ainsi que ses analogues linéaires ont été évalués pour leur effet potentiellement inducteur de la PDI. Cette évaluation a été réalisée in vivo et non par des techniques in vitro, en fonction des moyens à notre disposition.

Les isomères de position du 4-HBA, c'est à dire le 2-HBA et le 3-HBA ont été évalués dans le modèle d'IRC pour leur effet neuroprotecteur, ainsi que par western blot pour leur capacité potentielle à induire la PDI. Tester ces molécules avait pour but, tout d'abord de voir l'importance de la position du groupement hydroxyle sur le cycle benzénique et par là de déterminer les pré-requis structuraux nécessaires à 4-HBA pour l'obtention d'une neuroprotection significative.

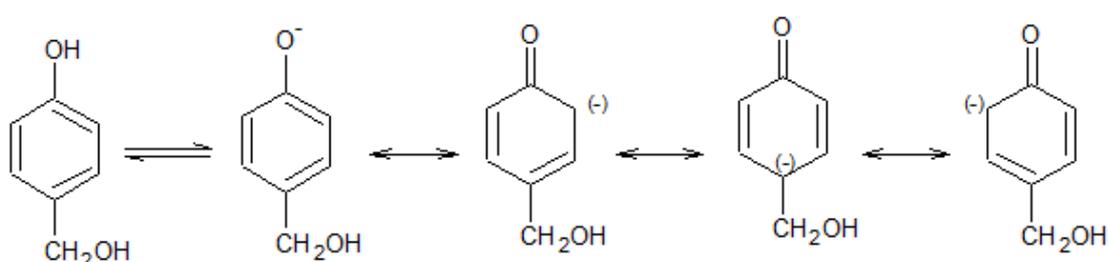
Il s'est avéré que le 4-HBA gardait l'exclusivité de l'effet neuroprotecteur, 2-HBA et 3-HBA n'apportant aucun effet neuroprotecteur significatif, même si une légère tendance de protection était observée dans le cas du 2-HBA (*Fig. 41*).

Au niveau de l'induction de la PDI déterminée par western blot, les résultats sont en adéquation avec ceux apportés dans le modèle d'IRC, à savoir que la PDI

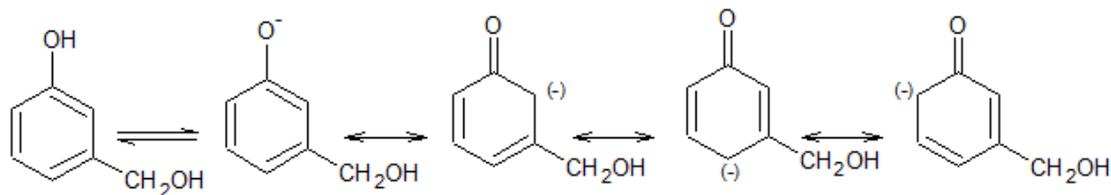
était seulement induite par 4-HBA et que les niveaux de la PDI pour les animaux traités par 2-HBA et par 3-HBA n'étaient pas significativement différents de celui des animaux témoins (auxquels on avait administré le véhicule) (*Fig. 43*). Même si on ne peut pas évaluer la capacité de ces molécules à se lier à la PDI, nous pouvons en déduire que la position en para du groupement hydroxyle sur la molécule de 4-HBA avait toute son importance pour l'induction de la PDI et pour la neuroprotection.

Cette condition structurelle n'est pas sans évoquer le 1,4-benzènediol, un activateur potentiel des ARE (antioxydant response élément) (Rushmore *et al.*, 1991). Dans cette idée, des séquences ARE sont retrouvées dans les domaines promoteurs du gène de la PDI (Tasanen *et al.*, 1992 ; Ejima *et al.*, 1999) et aussi d'autres gènes (Lyakhovich *et al.*, 2006) ; expliquant pourquoi l'activation des ARE régule diverses protéines.

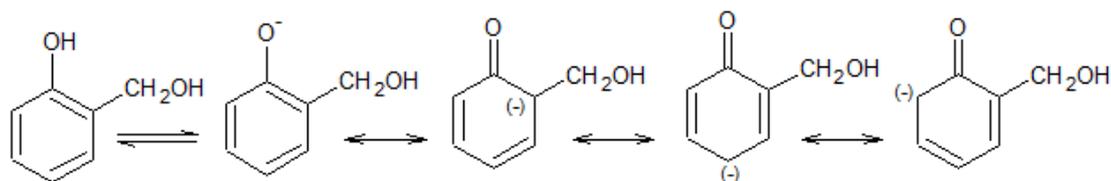
Pour expliquer l'importance de la position para sur le cycle benzénique, un effet de la délocalisation électronique sur le cycle aromatique avait été envisagé. Mais, des 3 isomères étudiés (4-HBA, 3-HBA, 2-HBA), la différence d'efficacité neuroprotectrice ne peut s'expliquer par un effet de délocalisation plus important pour le 4-HBA. En effet la figure ci-dessous (*Fig. 48*) montre que les formes ortho (2-HBA) et para (4-HBA) de l'alcool hydroxybenzylique sont similaires du point de vue de la délocalisation électronique. Une hypothèse de travail pour expliquer la différence d'efficacité neuroprotectrice pourrait être une action de la 4 HBA en tant que ligand activateur de l'expression de la PDI.



A



B



C

Fig. 48 : Schémas de délocalisation électronique pour les 3 isomères de position de l'alcool hydroxybenzylique (A : 4-HBA, B : 3-HBA, C : 2-HBA)

Nous avons voulu aller plus loin et déterminer si le cycle benzénique était nécessaire dans l'obtention d'un effet neuroprotecteur ou si le nombre d'atomes de carbone séparant les groupements hydroxyles était une caractéristique suffisante pour activer l'expression de la PDI. Pour cela, nous avons évalué le butanediol ainsi que le pentanediol, analogues linéaires respectifs du 3-HBA et du 4-HBA. Le nombre d'atomes de carbone séparant les deux groupements hydroxyles dans ces molécules sont respectivement de 4 (pour 3-HBA et BD) et de 5 (pour 4-HBA et PD) (Fig. 15 et 16). Les analogues linéaires ont donc été testés dans le modèle d'IRC. Nous n'avons observé aucun effet de ces molécules, que ce soit au niveau des lésions ischémiques (Fig. 46) ou au niveau des volumes d'œdèmes (Fig. 47). Une molécule linéaire, même si elle reprend certaines caractéristiques de la molécule originale (nombre d'atomes de carbone entre les groupements OH), n'apporte pas d'effet. Nous en avons conclu que le cycle benzénique était primordial dans l'effet neuroprotecteur. Suivant notre hypothèse que le 4-HBA agit comme ligand activateur de l'expression de la PDI, il semble que l'arrangement spatial typique du 4-HBA soit une condition sine qua non pour pouvoir observer un effet d'induction de la PDI qui apporte une neuroprotection dans l'IRC.

I.f. Effet de la 6-HFN dans l'IRC et sur PDI

Comme la 6-HFN est une molécule antioxydante qui montre des propriétés neuroprotectrices dans le modèle des crises audiogènes, la question de savoir s'il pourrait être actif dans l'IRC et avoir un effet sur la PDI s'est posée.

La 6-HFN a été évaluée dans le modèle d'IRC à une posologie se basant sur l'ED₅₀ déterminée par évaluation dans le modèle des crises audiogènes. La 6-HFN n'agissait pas dans l'IRC (*Fig. 31*). Ce résultat nous a mené à comparer les propriétés d'induction de la PDI cérébrale de la 6-HFN par rapport à celle de 4-HBA. En contraste au 4-HBA, la 6-HFN n'induit pas la PDI dans le cerveau de souris non ischémisées (*Fig. 33*).

Ces résultats nous indiquent que la 6-HFN n'agit pas dans le modèle d'IRC. Nous avons par là vérifié que cette molécule antioxydante ne possède pas d'effet sur l'induction de la PDI.

En résumé, l'induction de la PDI par le 4-HBA apporte un effet neuroprotecteur dans l'IRC. Le 4-HBA n'étant pas toxique, il peut être envisagé comme molécule thérapeutique potentielle dans le cadre des AVC.

De plus, 4-HBA possède des effets neuroprotecteurs dans des conditions autres que celles de l'IRC, à savoir le modèle des crises audiogènes, même si nous n'avons pas pu déterminer si dans ce cas, l'effet neuroprotecteur passe par l'induction de la PDI ou simplement par l'effet antioxydant de 4-HBA.

Pour que l'effet du 4-HBA soit efficace dans l'induction de la PDI, nos expériences montrent l'importance du cycle benzénique ainsi qu'une di-substitution en para des groupements hydroxyle et CH₂OH. Cependant le mode d'action de cette molécule reste encore à déterminer, même si nous pouvons supposer une action de la 4 HBA en tant que ligand activateur de l'expression de la PDI.

II. L'activation de la PDI dans la neuroprotection

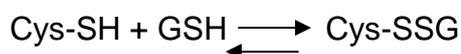
Lors de l'ischémie cérébrale, le niveau de la PDI est augmenté, ce qui a été mis en évidence par protéomique dans Neuronox et par western blot dans ce travail. L'induction de la PDI a montré des caractéristiques neuroprotectrices. Il est dès lors intéressant de rechercher ce qui a été publié sur le sujet et qui pourrait expliquer les mécanismes de neuroprotection dans laquelle la PDI est impliquée.

La PDI intervient dans les mécanismes cellulaires sous-jacents au stress oxydant induit par l'ischémie.

Un phénomène de stress oxydant a lieu lors de l'ischémie cérébrale, et notamment au moment de la reperfusion. Ce stress oxyde notamment les thiols des protéines par la formation de ponts disulfures au niveau des cystéines. La conformation des protéines en est modifiée.

Lorsqu'un stress oxydant apparaît, divers phénomènes cellulaires se mettent en route en vue de pallier à ce stress.

Le stress oxydant mène à la glutathionylation de la PDI. Cette réaction consiste en la modification post-translationnelle spécifique des résidus cystéines, et ce par l'addition du tripeptide glutathion (Townsend, 2007). Un pont disulfure est établi entre le résidu cystéine de la protéine et un GSH :



Cette réaction affecte la structure de la protéine mais est réversible (Townsend, 2007). La protéine sera protégée des dommages oxydants par un changement de conformation (Townsend *et al.*, 2006). La PDI, qui va subir la glutathionylation, sera inactivée et ne pourra plus remplir son rôle dans le repliement des protéines. Ces dernières, non repliées, vont s'accumuler dans le RE (Townsend, 2007).

Une réponse UPR (unfolded protein response) va alors se mettre en route (Townsend, 2007). Celle-ci va se traduire par plusieurs phénomènes qui sont (DeGracia *et al.*, 2004):

- le ralentissement de la synthèse protéique globale en vue d'empêcher l'arrivée d'autres protéines dans la lumière du RE (action au niveau traductionnel)
- la synthèse de nouvelles chaperonnes, dont la PDI, par l'activation de gènes codant pour ces protéines (action au niveau transcriptionnel). Cette surexpression de chaperonnes mène à la stimulation du processus de repliement des protéines (Gavilàn *et al.*, 2006)
- la dégradation des protéines mal repliées
- le déclenchement de l'apoptose des cellules lorsque ces divers processus ont échoués

Comme le RE se trouve dans des conditions réductrices, la PDI nouvellement synthétisée sera sous sa forme réduite. Un environnement plus réducteur protège le RE du stress oxydant et régule la PDI pour agir comme une chaperonne plutôt que comme une oxydoréductase (Papp *et al.*, 2006). De plus, seule la forme réduite de la PDI exerce des effets régénératifs sur les enzymes qui ont été inactivées par le stress oxydant (Ejima *et al.*, 1999).

Le stress oxydant va aussi altérer la fonction de ERO1 (Sevier *et al.*, 2008), une protéine qui rétablit la PDI sous sa forme oxydée (*Fig. 8*). Cette altération se fait par la formation d'un pont disulfure entre une cystéine non catalytique et une cystéine localisée dans le site actif (Baker *et al.*, 2008). On observe ici aussi une augmentation de la PDI réduite.

Les mécanismes mis en route lors du stress oxydant tendent à placer la protéine sous sa forme réduite, lui permettant d'agir ensuite en tant que réductase et isomérase ce qui entraîne un remaniement des ponts disulfures non natifs accumulés lors du stress oxydant (Sevier *et al.*, 2008). De cette façon, la PDI rétablit les protéines mal repliées suivant leur conformation initiale, prêtes pour subir un repliement correct

Sous sa forme réduite, PDI diminue les modifications au niveau des thiols des cystéines et restaure l'activité initiale des protéines (= régulation redox) (Leichert *et*

al., 2004). La PDI correspond alors à un système de réparation des protéines endommagées de façon oxydante (Shibata *et al.*, 2001).

La PDI va favoriser la dégradation associée au RE (ERAD). Ce mécanisme prévient de l'accumulation et de l'agrégation des protéines dans le RE. Les protéines qui échouent à atteindre leur état natif sont transloquées à travers la membrane du RE pour y être éliminées par les protéasomes cytosoliques (Sitia *et al.*, 2004). La PDI agira comme réductase pour permettre la translocation des protéines.

En plus d'agir comme réductase, PDI est régulée pour agir en tant que chaperonne. Elle protège spécifiquement les protéines des effets délétères des ROS en empêchant l'agrégation des protéines mal ou non repliées.

En résumé, lorsque la PDI est inactivée par le stress oxydant, des systèmes compensatoires, comme la réponse UPR ainsi que l'altération de ERO1, se mettent en route pour ré-augmenter le niveau de la PDI disponible. Lors de l'ischémie, le stress subi par les cellules est extrême et ces systèmes ne suffisent plus. En permettant à la PDI de se retrouver en plus grande quantité dans le RE, l'induction de la PDI par le 4-HBA va aider les systèmes compensatoires mis en route lors du stress oxydant en menant à la dégradation des protéines associées au RE (ERAD) ainsi qu'en déclenchant des systèmes de réparation des protéines.

La figure suivante récapitule les mécanismes mis en route et impliquant la PDI lors de l'ischémie reperfusion (*Fig. 49*).

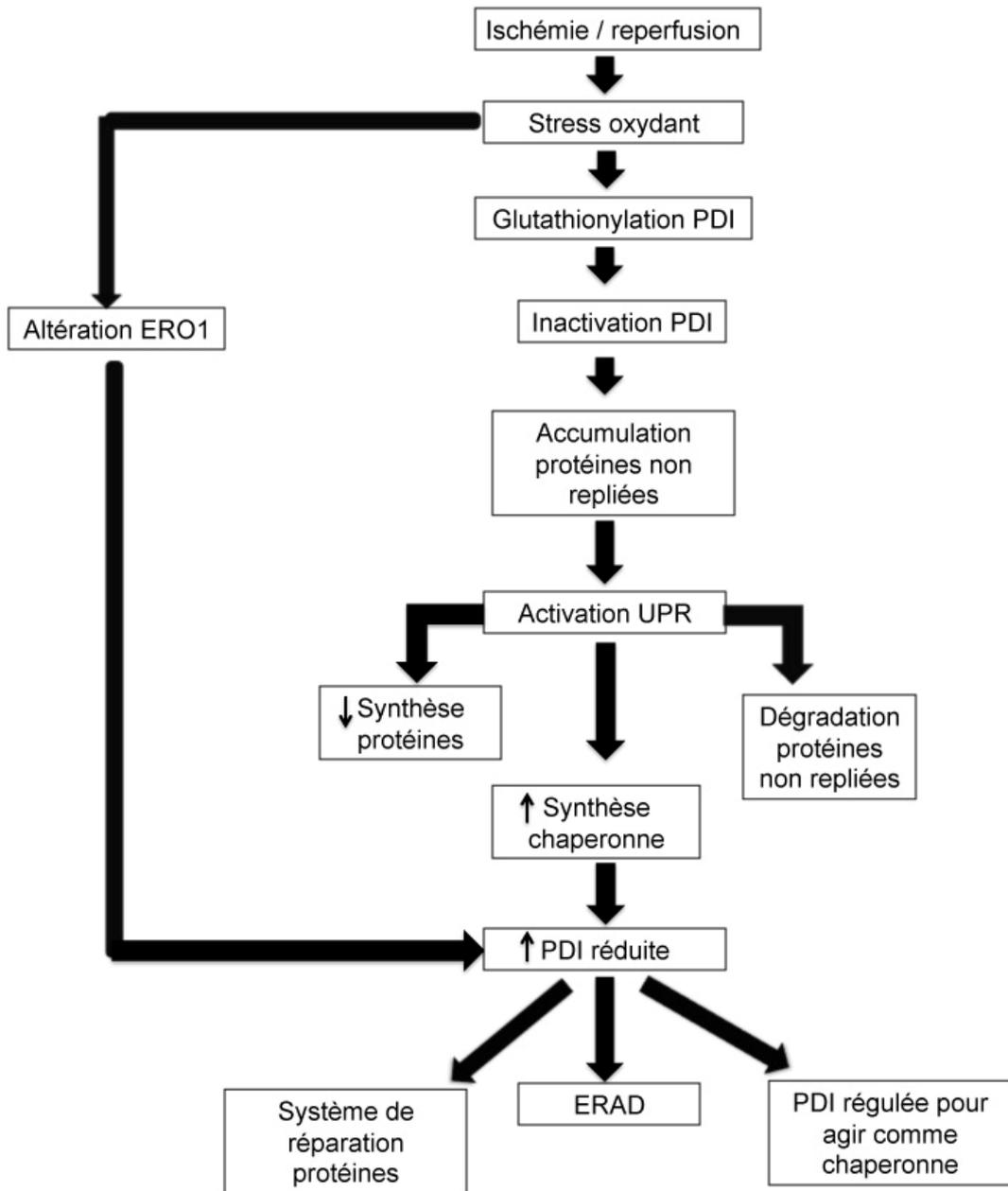


Fig. 49 : Schéma d'implication de la PDI lors de l'ischémie reperfusion

III. PDI et maladies neurodégénératives

La réponse UPR face aux protéines mal repliées est une réponse physiologique et de nombreuses études récentes montrent que son altération peut être à l'origine de nombreuses pathologies humaines, et parmi elles des maladies neurodégénératives. La PDI étant impliquée dans la réponse UPR ce paragraphe introduit quelques articles récents qui présentent les mécanismes pouvant expliquer cette neuroprotection au delà de l'IRC. L'augmentation du taux de la PDI par des molécules telles que le 4-HBA pouvant alors présenter bien d'autres intérêts.

III.a. Repliement des protéines et maladies neurodégénératives

La maladie d'Alzheimer est caractérisée pathologiquement par le dépôt extracellulaire de la protéine amyloïde β ($A\beta$) sous forme de plaques, par la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (agrégats intracellulaires filamenteux de protéines tau associés aux microtubules), et par la mort neuronale dans les lésions cérébrales (Imaizumi *et al.*, 2001). L'accumulation de $A\beta$ dans le cerveau est toxique et rend les neurones vulnérables à l'excitotoxicité et à l'apoptose. La production de ces peptides est réalisée par le clivage protéolytique anormal de la glycoprotéine membranaire « amyloïd precursor protein » (APP) par des formes mutées des présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2). PS1 et PS2 sont des γ -secrétases qui résident principalement dans le RE et sont sensibles au stress oxydant. (Imaizumi *et al.*, 2001).

Au niveau du RE, il a été montré que les présénilines sont capables d'interagir avec des protéines transmembranaires impliquées dans la réponse UPR et plus particulièrement IRE-1 (inositol requiring enzyme 1), PERK (PKR-like ER protein kinase) et ATF6 (activating transcription factor 6) dont l'activation permet la mise en place de la réponse UPR. En fait dans des formes familiales de la maladie d'Alzheimer il semble que l'expression des formes mutantes de PS-1 et PS-2 entraîne une diminution de la réponse UPR en diminuant l'activation de IRE1, PERK et ATF6, ce qui se traduirait par une plus forte vulnérabilité du RE face au stress oxydant (Foufelle *et al.*, 2007).

La maladie de Parkinson est quant à elle associée à une perte progressive des neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire (Henchcliffe et al., 2008). La base de l'étiologie de cette maladie neurodégénérative réside en la vulnérabilité des neurones dopaminergiques face au stress oxydant et à l'échec de l'élimination des protéines accumulées de façon anormale au sein du RE (Mandel et al., 2007).

Parkin est une protéine qui fait partie d'un complexe d'ubiquitination menant à la dégradation des protéines par la voie du protéasome. En fait il semble que le système UPR induit une up-régulation de Parkin, pour promouvoir la dégradation coordonnée de protéines mal repliées. D'ailleurs les cellules surexprimant Parkin, sont particulièrement résistantes à la mort cellulaire induite par l'accumulation de telles protéines. Les formes mutantes de Parkin, trouvées chez les patients atteints d'une forme familiale de la maladie de Parkinson montrent une perte de cette activité de dégradation. Cela suggère que, comme c'est le cas dans la maladie d'Alzheimer, les neurones des patients atteints de la maladie de Parkinson semblent moins bien protégés de la neurotoxicité apparaissant lors des conditions du stress du RE (Paschen et Frandsen, 2001)

III.b. PDI et neuroprotection dans Alzheimer et Parkinson

Dans les cerveaux atteints des maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, la PDI est S-nitrosylée. Cette S-nitrosylation consiste au transfert d'un oxyde nitrique (NO) vers le thiol d'un résidu cystéine de la PDI (Uehara *et al.*, 2006 ; Lipton *et al.*, 2007). L'activité enzymatique de la PDI est alors inhibée, ce qui peut mener à l'accumulation des protéines mal repliées au niveau du RE (Uehara *et al.*, 2006 ; Nakamura et Lipton, 2007 ; Chung, 2007 ; Lipton *et al.*, 2007). La PDI S-nitrosylée (SNO-PDI) n'est retrouvée qu'au niveau des cerveaux atteints de maladies neurodégénératives, et n'existe pas en quantité détectables dans le cerveau normal (Nakamura et Lipton, 2007 ; Forrester *et al.*, 2006).

Cette nitrosylation induite par le NO est une indication supplémentaire de l'implication de la PDI comme neuroprotecteur lors du stress induit dans le RE dans les maladies neurodégénératives.

On peut donc imaginer que l'induction de la PDI par le 4-HBA, et l'augmentation de ses fonctions réductrices, isomérase et de chaperonnes qui s'en suivront, puissent permettre une diminution de la quantité de protéines mal repliées (et non dégradées). Ceci ayant comme conséquence directe d'améliorer la réponse UPR et, en situation de stress oxydant, accroître la survie des cellules nerveuses.

IV. Conclusion et perspectives

Si la recherche de nouveaux moyens de prévention des AVC paraît essentielle, la thérapeutique doit également disposer de moyens de protection curatifs lors de la prise en charge clinique d'ischémies cérébrales, et ce dans le but de limiter l'extension des lésions et du handicap qui en découle. Les approches pharmacologiques envisagées dans ce travail montrent que l'induction de la PDI par le 4-HBA pourrait représenter une cible pertinente dans le développement d'une protection cérébrale lors du processus d'IRC.

Le 4-HBA, molécule d'intérêt dans cette étude, diminue les volumes des zones ischémiées dans nos modèles expérimentaux. Le 4-HBA, n'étant pas toxique aux concentrations efficaces, peut donc être une molécule d'intérêt dans le traitement des AVC. Nous avons montré que dans nos modèles le 4-HBA induit la PDI et que ses effets semblent PDI-dépendant car ils sont antagonisés par un inhibiteur spécifique de la PDI, la bacitracine. Nos études sur les molécules apparentées au 4-HBA ne nous ont pas permis de trouver un autre ligand aussi efficace mais nous ont apporté des indications sur les caractéristiques structurales que le 4-HBA doit posséder afin d'agir par un mécanisme supposé de "ligand activateur".

Nous en avons conclu que l'induction de la PDI apporte un effet neuroprotecteur significatif dans l'ischémie reperfusion cérébrale. Au sein du RE, la PDI fait partie d'un système (dont font partie ERO1 et UPR) qui permet la maturation correcte des protéines. Lors d'un stress oxydant, l'induction de la PDI et donc de son activité réductase et isomérase a un rôle protecteur pour la cellule. Mais lors de l'ischémie, le stress subi par les cellules nerveuses est extrême et les systèmes compensatoires comme la réponse UPR ainsi que l'altération de ERO1 ne suffisent plus. La mort des cellules par apoptose s'ensuit. Il est envisageable qu'une augmentation de la quantité de PDI, pourrait se traduire par une augmentation de sa fonction réductrice et favoriserait ainsi l'établissement des ponts disulfures et le repliement correct des protéines dans le RE. De plus une augmentation de sa fonction d'isomérisation serait bénéfique au niveau du traitement des protéines mal

repliées (ERAD) ainsi qu'au niveau des systèmes de réparation des protéines. L'activation de la PDI dans ces conditions de stress pourrait se traduire par une diminution de la mortalité cellulaire. Il semble donc intéressant d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes d'induction de la PDI par le 4-HBA et de cette façon améliorer son effet protecteur dans le stress oxydant et l'IRC.

Cette approche de l'induction de la PDI pourrait de plus se montrer efficace au niveau des pathologies neurodégénératives que sont les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson. En effet, ces pathologies neurodégénératives sont caractérisées par l'agrégation de protéines mal ou non repliées. L'induction de la PDI pourrait permettre de favoriser leur réduction ou leur isomérisation dans la bonne conformation ; ce qui réduirait l'impact du stress induit par cette accumulation protéique. L'étude du 4-HBA et de la bacitracine dans des modèles de pathologies neurodégénératives comme le modèle MPTP d'induction de la maladie de Parkinson pourrait confirmer ou infirmer l'implication de l'induction de la PDI dans des mécanismes neuroprotecteurs autres que l'ischémie.

Enfin la réponse UPR est un mécanisme physiologique développé par toutes les cellules en réponse à une arrivée massive de protéines dans la lumière du RE. Il serait intéressant de déterminer des stratégies qui, combinées à l'induction de la PDI, pourraient agir sur cette voie. Ainsi, utilisé en combinaison d'activateurs de la PDI, des molécules activatrices de la voie UPR pourraient réduire le fardeau du repliement des protéines par les systèmes de chaperonne. On pourrait par exemple tester une petite molécule de basse toxicité, le Salubrinal[®], qui a montré des propriétés comme régulateur de la réponse UPR, et qui permet de rééquilibrer la capacité de repliement des protéines (Wiseman *et al.*, 2005). Le Salubrinal[®] exercerait une action protectrice en empêchant la déphosphorylation du facteur eIF2 α impliqué dans l'activation de la réponse UPR (Boyce *et al.*, 2005). Cette molécule pourrait diminuer la pathologie associée à un stress cellulaire prolongé en réponse à l'agrégation des protéines. De même elle pourrait diminuer la réponse liée au stress durant l'ischémie et les maladies neurodégénératives. Même si son efficacité dans le traitement de ces pathologies reste à démontrer (Foufelle *et al.*, 2007), son effet en combinaison avec le 4-HBA serait sans doute intéressante à étudier dans nos modèles.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, Ruf W. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006,103(38):13932-13937
- Alanen HI, Williamson RA, Howard MJ, Hatahet FS, Salo KEH, Kauppila A, Kellokumpu S, Ruddock LW. Erp27, a new non-catalytic endoplasmic reticulum located human PDI-family membre, interacts with Erp57. *Journal of Biological Chemistry*, 2006
- Alberts MJ, Ovbiagele B. Current strategies for ischemic stroke prevention: role of multimodal combination therapies. *J Neurol*. 2007; 254(10):1414-26.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science Textbook, Fifth Edition 2007
- Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, Hurn PD. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke*, 1998, 29: 159–165.
- Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasanati M. Post ischemic brain damage : pathophysiology and rôle of inflammatory médiateurs. *FEBS journal*, 2009, 279 :13-26
- Appenzeller-Herzog C, Ellgaard L. The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta.*, 2008, 1783(4):535-48
- Ayata C, Ropper AH. Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci* 2002;9:113-24
- Bac, P., Maurois, P., Dupont, C., Pages, N., Stables, J.P., Gressens, P., Evrard, P. & Vamecq, J. Magnesium deficiency-dependent audiogenic seizures (MDDASs) in adult mice: a nutritional model for discriminatory screening of anticonvulsant drugs and original assessment of neuroprotection properties. *J. Neurosci.*,1998,18, 4363-4373
- Baker KM, Chakravarthi S, Langton KP, Sheppard AM, Lu H, Bulleid NJ. Low reduction potential of ERO1alpha regulatory disulphides ensures tight control of substrate oxidation. *The EMBO journal*, 2008, 27:2988-2997
- Betz AL, Randall J, Martz D. Xanthine oxidase is not a major source of free radicals in focal cerebral ischemia. *Am J Physiol* 1991;260:H563-68
- Blas M, Briesacher KS, Lobato EB. Bacitracin irrigation: a cause of anaphylaxis in the operating room. *Anesthesia and analgesia*, 2000, 91(4):1027-1028
- Bonde C, Noraberg J, Noer H and Zimmer J. Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. *Neurosciences* 2005; 136(3):779-94
- Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 1977;78:67-82
- Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*. 2005; 307(5711):935-939
- Brinker G, Franke C, Hoehn M, Uhlenkücken U, Hossmann KA Thrombolysis of cerebral clot embolism in rat: effect of treatment delay. *Neuroreport.*, 1999; 10(16):3269-3272

Cabral CM, Liu Y, Sifers RN. Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2001, 26 (10) : 619-624

Cai H, Want CC, Tsou CL. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269: 24550-24552

Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2001, 21, 2–14

Chen Y, Zhang Y, Yin Y, Gao G, Li S, Jiang Y, Gu X, Luo J. SPD--a web-based secreted protein database. *Nucleic Acids Research*. 2005, 33: D169-173

Choi JH, Lee DU. A new citryl glycoside from *Gastrodia elata* and its inhibitory activity on GABA transaminase. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 54(12) : 1720-1721

Christis C, Lubsen NH, Braakman I. Protein folding includes oligomerization – examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *FEBS Journal*, 2008, 275 : 4700–4727

Chung KK. Say NO to neurodegeneration: role of S-nitrosylation in neurodegenerative disorders. *Neurosignals*. 2006-2007;15(6):307-313

Clive DR, Greene JJ. Association of protein disulfide isomerase activity and the induction of contact inhibition. *Experimental cell research*, 1994;214(1):139-44

Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, 38 : 1433-1444

Creighton TE, Zapun A, Darby NJ Mechanisms and catalysts of disulfide bond formation in proteins. *Trends Biotechnology*. 1995; 13(1):18-23

Darby NJ, Penka E, Vincentelli R. The multi-domain structure of protein disulfide isomerase is essential for high catalytic efficiency. *Journal of molecular biology*, 1998, 276(1):239-247

DeGracia DJ, Montie HL. Cerebral ischemia and the unfolded protein response. *Journal of neurochemistry*, 2004, 91:1-8

De Keyser J, Sulter G, Luiten PG. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: Are we doing the right thing? *TINS*, 1999, 22(12) : 535-540

Del Zoppo GJ, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003;23:879-894

Deplanque D, Gelé P, Pétrault O, Six I., Furman C, Bouly M, Nion S, Dupuis B, Leys D, Fruchart J-C, Cecchelli R, Staels B, Duriez P, Bordet R. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. *The Journal of Neurosciences*, 2003, 23(15) : 6264-6271

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz M. Pathobiology of ischaemic stroke : an integrated view. *Trends neurosciences* 1999, 22 : 391-397

Dobson CM. Protein folding and its links with human disease. *Biochemical Society symposium 2001*;(68):1-26.

Donnan GA, Dewey HM, Davis SM. Stroke. *Lancet* 2008;371:1612-23

Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 2008, 55 : 310-318

Dukes AA, Van Laar VS, Cascio M, Hastings TG. Changes in endoplasmic reticulum stress proteins and aldolase A in cells exposed to dopamine. *J Neurochem.* 2008 Jul;106(1):333-346

Dyck ED, Vadas P. Anaphylaxis to topical bacitracin. *Allergy.* 1997, 52(8):870-871

Edaravone Acute Infarction Study Group. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis.* 2003;15(3):222-229

Ejima K, Nanri H, Araki M, Uchida K, Kashimura M, Ikeda M. 17beta-estradiol induces protein thiol/disulfide oxidoreductases and protects cultured bovine aortic endothelial cells from oxidative stress. *Eur J Endocrinol.* 1999;140(6):608-13.

Ellgaard L, Ruddock LW. The human protein disulfide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Reports*, 2005, 6 : 28-32

Fatahzadeh M, Glick M. Stroke: epidemiology, classification, risk factors, complications, diagnosis, prevention, and medical and dental management. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2006, 102 : 180-191

Freedman RB, Klappa P, Ruddock LW. Protein disulfide isomerases exploit synergy between catalytic and specific binding domains. *EMBO Reports*, 2002, 3 :136-140

Frénisy M.-C., Minot D., Soutenet M., Amiot N. Cerebral vascular incident: psychopathological approach and neuropsychological approach. About one case: M.J. *Annales Médico Psychologiques*, 2005, 163 : 65-72

Frijns CJM, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke*, 2002, 33 :2115-2122

Forrester MT., Benhar M, Stamler JS. Nitrosative Stress in the ER: A New Role for S-Nitrosylation in Neurodegenerative Diseases. *ACS Chem. Biol.*, 2006,1 (6) :355-358

Foufelle et Ferré. La réponse UPR : son rôle physiologique et physiopathologique. *Médecine et Sciences*, 2007, 23(3).

Gasche Y, Copin J-C. Blood-brain barrier pathophysiology and ischaemic brain oedema. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 2003, 22 : 312-319

Gavilàn MP, Vela J, Castano V, Ramos B, del Rio JC, Vitorica J, Ruano D. Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus. *Neurobiology of aging*, 2006, 27 :973-982

- Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke for ischemic stroke : Past, present and future. *Neuropharmacology* 2008;39:1556-62
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. 2003, 16;425(6959):671-2.
- Goldberger RF, Epstein CJ, Anfinsen CB. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *The Journal of biological chemistry*, 1963; 238:628-435
- Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Flow and Metabolism*, 2001, 21 : 99-109
- Green AR. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke : reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *Br J Pharmacol* 2008;153:S325-38ic
- Grotta J. Lubeluzole treatment of acute ischemic stroke. The US and Canadian Lubeluzole Ischemic Stroke Study Group. *Stroke*. 1997;28(12):2338-2346
- Guix FX, Uribealago I, Coma M, Muñoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology*, 2005, 76 : 126-152
- Ha JH, Lee DU, Lee JT, Kim JS, Yong CS, Kim JA, Ha JS, Huh K. 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* B1. is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain. *Journal of ethnopharmacology*, 2000, 73(1-2):329-33
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghro Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D, ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Eng J Med* 2008;359:1317-29
- Hallenbeck JM, Dutka AJ. Background review and current concepts of reperfusion injury. *Arch Neurol* 1990;47:1245-54
- Hancock R, Fitz-James PC. Some differences in the action of penicillin, bacitracin, and vancomycin on *Bacillus megaterium*. *Journal of bacteriology*, 1964;87(5):1044-1050
- Harper JD, Lansbury PT Jr. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 1997, 66 : 385-407
- Hata R, Maeda K, Hermann D, Mies G, Hossman KA. Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*, 2000, 20:306-315
- Hatahet F, Ruddock LW. Substrate recognition by the protein disulfide isomerase. *FEBS Journal*, 2007, 274 : 5223-5234
- Hattori N, Wang M, Taka H, Fujimura T, Yoritaka A, Kubo SI, Mochizuki H. Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. *Parkinson and related disorders*, 2009, 15(1) :S35-S38

Haugstetter J, Blicher T, Ellgaard L. Identification and characterisation of a novel thioredoxin-related transmembrane protein of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 : 8371-8380

Hayashi J, Sekine T, Deguchi S, Lin Q, Horie S, Tsuchiya S, Yano S, Watanabe K, Ikegami F. Phenolic compounds from *Gastrodia* rhizome and relaxant effects of related compounds on isolated smooth muscle preparation. *Phytochemistry*, 2002, 59(5) : 513-519

Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008;4(11):600-609

Herath W, Mikell JR, Hale AL, Ferreira D1, Khan IA. Microbial Metabolism Part 9. Structure and Antioxidant Significance of the Metabolites of 5,7-Dihydroxyflavone (Chrysin), and 5- and 6-Hydroxyflavones. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 2008, 56 (4) 418-42

Higuchi T, Watanabe Y, Waga I. Protein disulfide isomerase suppresses the transcriptional activity of NF-kappaB. *Biochemical and biophysical research communications*, 2004, 318(1):46-52

Hill MD, Hachinski V. Stroke treatment: time is brain. *Lancet*. 1998; 352 Suppl 3:SIII10-4

Holdway DA, Dixon DG, Kaiser KLE. The acute toxicity of pulse-dosed, para-substituted phenols to larval American flagfish (*Jordanella floridae*): a comparison with toxicity to photoluminescent bacteria and predicted toxicity using log K_{ow} . *The Science of The Total Environment*, 1991, 104 (3):229-237

Hossman KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994 ;36 :557-65

Hossman KA. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cellular and molecular neurobiology*, 2006, 26(7/8):1057-1083

Hsieh CL, Tang NY, Chiang SY, Hsieh CT, Lin JG. Anticonvulsive and free radical scavenging actions of two herbs, *Uncaria Rhynchophylla* (Miq.) Jack and *Gastrodia elata* Bl., in Kainic acid-treated rats. *Life sciences*, 1999, 65 (20) : 2071-2082

Hsieh CL, Chiang SY, Cheng KS, Lin YH, Tang NY, Lee CJ, Pon CZ, Hsieh HT. Anticonvulsive and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* Bl. in kainic acid-treated rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2001, 29(2) : 331-341

Hsieh MT, Wu CR, Hsieh CC. Ameliorating effect of p-hydroxybenzyl alcohol on cycloheximide-induced impairment of passive avoidance response in rats: interactions with compounds acting at 5-HT1A and 5-HT2 receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1998, 60 : 337-343

Hsieh MT, Wu CR, Chen CF. *Gastrodin* and p-hydroxybenzyl alcohol facilitate memory consolidation and retrieval, but not acquisition, on the passive avoidance task in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 1997, 56(1):45-54

Huang NK, Chern Y Fang JM, Lin CI, Chen WP, Lin YL. Neuroprotective principles from *Gastrodia elata*. *Journal of natural products*, 2007, 70 : 571-574

- Huber-Wunderlich M, Glockshuber R. A single dipeptide sequence modulates the redox properties of a whole enzyme family. *Folding and Design*, 1998, 3 (3) : 161-171
- Hurn PD, Macrae IM. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 2000, 20: 631–652.
- Hurn PD, Brass LM. Estrogen and stroke: a balanced analysis. *Stroke*, 2003, 34: 338–341.
- Hyeon-Ju K, Kwang-Deog M, Dong-Seok L, Sang-Han L. Ethyl ether fraction of *Gastrodia elata* Blume protects amyloid peptide-induced cell death. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 84 : 95-98
- Iadecola C, Zhang F, Xu S et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:378-84
- Imaizumi K, Miyoshi K, Katayama T, Yoneda T, Taniguchi M, Kudo T, Tohyama M. The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1536 : 85-89
- Jessop CE, Bulleid NJ. Glutathione directly reduces an oxidoreductase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *The journal of biological chemistry*, 2004(b), 279(53):55341-55347
- Jessop CE, Chakravarthi S, Watkins RH, Bulleid NJ. Oxidative protein folding in the mammalian endoplasmic reticulum. *Biochemical society transactions*, 2004 (b), 32:655-658
- Jung JW, Yoon BH, Oh HR, Ahn JH, Kim SY, Park SY, Ryu JH. Anxiolytic-like effects of *Gastrodia elata* and its phenolic constituents in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29(2) : 261-265
- Junhua H, Guilian W. Comparison studies on pharmacological properties of injection *Gastrodia elata*, gastrodin-free fraction and gastrodin. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 1989, 11 : 147-150
- Justicia C, Panes J, Sole S, et al. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(12):1430-1440.
- Kadokura H, Katzen F, Beckwith Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annual review of biochemistry*, 2003, 72:111-35.
- Katsura K, Kristian T, Siesjo BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 1994;22: 991-6
- Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993;23(1):21-48
- Kersteen EA, Raines RT. Catalysis of protein disulfide isomerase and small molecule mimics. *Antioxidants & Redox Signalling*, 2003, 5 : 413-424
- Kim PS, Kwon O-Y, Arvan P. An Endoplasmic Reticulum Storage Disease Causing Congenital Goiter with Hypothyroidism. *The Journal of Cell Biology*, 1996, 133 (3) : 517-527

Kim HJ, Hwang IK, Won MH. Vanillin, 4-hydroxybenzyl aldehyde and 4-hydroxybenzyl alcohol prevent hippocampal CA1 cell death following global ischemia. *Brain Res.* 2007;1181:130-141

Kirshner HS. Therapeutic interventions for prevention of recurrent ischemic stroke. *The American journal of managed care*, 2008, 14(6 Suppl 2):S212-26

Klappa P, Ruddock LW, Darby NJ, Freedman RB. The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins. *The EMBO journal.* 1998, 17(4):927-935

Koehler CM, Beverly KN, Leverich EP. Redox pathways of the mitochondrion. *Antioxidants & redox signaling*, 2006, 8(5-6):813-22

Kriegelstein J. Excitotoxicity and neuroprotection. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1997, 5 : 181-187

Kristiàn T, Siesjö BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 1998;29:705-18

Kruszewski M. The role of labile iron pool in cardiovascular diseases. *Acta Biochimica Polonica*, 2004, 51 : 471-480

Kurukulasuriya LR, Govindarajan G, Sowers J. Stroke prevention in diabetes and obesity. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2006, 4 : 487-502

Lee YS, Ha JH, Yong CS, Lee DU, Huh K, Kang YS, Lee SH, Jung MW, Kim JA. Inhibitory effects of constituents of *Gastrodia elata* Bl. on glutamate-induced apoptosis in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Archives of Pharmacal Research*, 1999, 22(4) : 404-9

Lee JM, Grabb M, Zipfel G et al. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 2000;106:723-31

Lee JY, Jang YW, Kang HS, Moon H, Sim SS, Kim CJ. Anti-inflammatory action of phenolic compounds from *Gastrodia elata* root. *Archives of Pharmacal Research*, 2006, 29(10) : 849-858

Leichert LI, Jakob U. Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLoS Biol.* 2004 Nov;2(11):e333.

Leys D., Lucas C., Gautier C., Hachulla E. & Pruvo J.P. Accidents ischémiques cérébraux du sujet jeune [Ischemic strokes in young adults]. *EMC-Neurologie* 2004, 1 : 375-389

Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J. Neurotrauma* 2000, 17, 871–890.

Lewis MJ, Pelham HR. A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature*, 1990, 348 (6297):162-163

Lilie H, McLaughlin S, Freedman R, Buchner J. Influence of protein disulfide isomerase (PDI) on antibody folding in vitro. *The Journal of biological chemistry* 1994, 269(19):14290-14296

Lim EJ, Ka,g HJ, Jung HJ, Park EH. Anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of 4-hydroxybenzyl alcohol. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 2007, 59(9) : 1235-1240

Lin T-N, He YY, Wu G, Khan CY. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke*, 1993, 24 : 117-121

Lin FL, Woodmansee D, Patterson R. Near-fatal anaphylaxis to topical bacitracin ointment. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998, 101(1 Pt 1):136-137

Lindsberg PJ, Hallenbeck JM, Feuerstein G. Platelet-activating factor in stroke and brain injury. *Ann Neurol* 1991;30:117-29

Lipton SA, Gu Z, Nakamura T. Inflammatory mediators leading to protein misfolding and uncompetitive/fast off-rate drug therapy for neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol*. 2007;82:1-27

Liu J, Mori A. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* Bl. And *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks. *Neuropharmacology*, 1992, 31 : 1287-1298

Liu J, Mori A. Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxybenzyl alcohol and vanillin : effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. *Neuropharmacology*, 1993, 32 : 659-669

Liu SH, Pan IH, Chu IM. Inhibitory effect of p-hydroxybenzyl alcohol on tyrosinase activity and melanogenesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30(6) : 1135-1139

Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathology* 1999;9:119-31

Lyakhovich VV, Vavilin VA, Zenkov NK, Menshchikova EB. Active defense under stress. The antioxidant responsive element. *Biochemistry*, 2006, 71:962–974306

MacDonald RI, MacDonald RC, Cornell NW. Perturbation of liposomal and planar lipid bilayer membranes by bacitracin-cation complex. *Biochemistry*. 1974 Sep 10;13(19):4018-4024

Maurois, P., Gueux, E. & Rayssiguier, Y. (1989) Protective effect of severe magnesium deficiency on *Plasmodium chabaudi* infection. *Magnes Res*, 2, 183-187

Ojemann LM, Nelson WL, Shin DS, Rowe AO, Buchanan RA. Tian ma, an ancient Chinese herb, offers new options for treatment of epilepsy and other conditions. *Epilepsy and behavior*, 2006, 8 : 376-383

Mandel SA, Fishman T, Youdim MB. Gene and protein signatures in sporadic Parkinson's disease and a novel genetic model of PD. *Parkinsonism Relat Disord*. 2007;13 Suppl 3:S242-S247

Mattson MP, Chana SL. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*, 2003, 34:385–397

Mayer M, Kies U, Kammermeier R, Buchner J. BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 2000, 275(38):29421-29425

- McCullough LD, Hurn PD. Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.*, 2003, 14: 228–235
- Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*, 2005, 121(7):965-967
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA. Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 1993;4:709-11
- Ming LJ, Epperson JD. Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *Journal of inorganic biochemistry*, 2002, 91(1):46-58
- Ming LJ. Structure and function of "metalloantibiotics". *Medicinal research reviews*, 2003, 23(6):697-762
- Mizunaga T, Katakura Y, Miura T, Maruyama Y. Purification and characterization of yeast protein disulfide isomerase. *Journal of Biochemistry*, 1990;108(5):846-851
- Molinari M, Helenius A. Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. *Nature*, 1999, 402(6757):27-29.
- Nakamura T and Lipton SA. S-Nitrosylation and uncompetitive/fast off-rate (UFO) drug therapy in neurodegenerative disorders of protein misfolding. *Cell Death and Differentiation*, 2007, 14 :1305–1314
- Nakatsukasa K, Brodsky JL. The recognition and retranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic*, 2008, 9 : 861-870
- Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med* 2000;36:483-506
- Nita DA, Nita V, Spulber S, Moldovan M, Popa DP, Zagrean AM, Zagrean L. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - A biochemical study in rat. *J. Cell. Mol. Med.* 2001, 5, 163–170
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 1997;17:2746-55
- Noiva R. Protein disulfide isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Cell & Developmental Biology*, 1999, 10 : 481-493
- Nomura Y. Neuronal apoptosis and protection: effects of nitric oxide and endoplasmic reticulum – related proteins. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 27(7) : 961-963
- Olney JW. Inciting excitotoxic cytotoxicity among central neurons. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1986, 203 : 631-645
- O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B : a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 1997;20:252-258.
- O'Neill S, Robinson A, Deering A, Ryan M, Fitzgerald DJ, Moran N. The platelet integrin alpha IIb beta 3 has an endogenous thiol isomerase activity. *J Biol Chem.* 2000 Nov 24;275(47):36984-90.

Paschen W. Endoplasmic réticulum : a primary target in various acute disorders and dégénérative diseases of the brain. *Cell calcium*, 2003, 34 :365-383

Paschen W, Frandsen A. Endoplasmic réticulum dysfunction – a common denominator for cell injury in acute and dégénérative diseases of the brain ? *Journal of neurochemistry*, 2001, 79 : 719-725

Paschen W. Dependence of vital cell function on endoplasmic reticulum calcium levels: implications for the mechanisms underlying neuronal cell injury in different pathological states. *Cell Calcium*. 2001;29(1):1-11

Paget MS, Buttner MJ. Thiol-based regulatory switches. *Annual review of genetics*, 2003;37 : 91-121.

Parnham M, Sies H. Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000;9(3):607-619

Paul R, Zhang ZG, Eliceiri BP, Jiang Q, Boccia AD, Zhang RL, Chopp M, Cheresch DA. Src deficiency or blockade of Src activity in mice provides cerebral protection following stroke. *Nat Med*. 2001;7(2):222-227

Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 1977, 83 : 346-356

Petruzzelli L, Takami M, Humes HD. Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med.*, 1999;106(4):467-476.

Piccini A, Fassio A, Pasqualetto E, Vitali A, Borghi R, Palmieri D, Nacmias B, Sorbi S, Sitia R, Tabaton M. Fibroblasts from FAD-linked presenilin 1 mutations display a normal unfolded protein response but overproduce Ab42 in response to tunicamycin. *Neurobiology of disease*, 2004, 15:380-386

Pinard E, Engrand N. Physiopathologie de l'ischémie cérébrale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 1999, 18 : 574-582

Planas AM, Soriano MA, Berruezo M, Justicia C, Estrada A, Pitarch S, Ferrer I. Induction of Stat3, a signal transducer and transcription factor, in reactive microglia following transient focal cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci*. 1996;8(12):2612-2618

Nakka VP, Gusain A, Mehta SL, Raghubir R. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischémia : multiple neuroprotective opportunities. *Molecular neurobiology*, 2008, 37 :7-38

Papp E, Száraz P, Korcsmáros T, Csermely P. Changes of endoplasmic reticulum chaperone complexes, redox state, and impaired protein disulfide reductase activity in misfolding alpha1-antitrypsin transgenic mice. *FASEB J*. 2006; 20(7):1018-1020

Puig A, Lyles MM, Noiva R, Gilbert HF. The role of the thiol/disulfide centers and peptide binding site in the chaperone and anti-chaperone activities of protein disulfide isomerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(29) 19128-19135

Rahman RM, Nair SM, Appleton I. Current and future pharmacological interventions for the acute treatment of ischaemic stroke. *Current Anaesthesia & Critical Care*, 2005, 16 : 99-109

Rami A, Bechmann I, Stehle JH. Exploiting endogenous anti-apoptotic proteins for novel therapeutic strategies in cerebral ischemia. *Progress in neurobiology*, 2008, 85:273-296

Riley PA, <Cooksey CJ, Johnson CI, Land EJ, Latter AM, Ramsden CA. Melanogenesis-targeted anti-melanoma pro-drug development: effect of side-chain variations on the cytotoxicity of tyrosinase-generated ortho-quinones in a model screening system. *European Journal of Cancer*, 1997, 35 (1):135-143

Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wilson M, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 2008; 117(4):e25-146

Rushmore T, Morton M, Pickett C. The antioxidant responsive element: activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.*, 1991, 226, 11632–11639.317

Ryser HJ, Levy EM, Mandel R, DiSciullo GJ. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994; 91(10):4559-63

Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene LA. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2002 15;22(24):10690-10698.

Samson Y, Iapergue B, Hosseini H. Inflammation et accidents ischémique cérébral aigu. Données actuelles et perspectives. *Rev Neurol*, 2005, 161(12) :1177-1182

Savitz SI, Savitz MH, Goldstein HB, Mouracade CT, Malangone S. Topical irrigation with polymyxin and bacitracin for spinal surgery. *Surgical neurology*, 1998, 50(3):208-212

Scogin DA, Mosberg HI, Storm DR, Gennis RB. Binding of nickel and zinc ions to bacitracin A. *Biochemistry* 1980;19:3348–3352

Selvam P, Mahalingam R J. Ortho-selective Hydroxymethylation of Phenol over Microporous Titanoaluminophosphate Molecular Sieves. *Bull. Catal. Soc. India*,2003, 2 : 56-59

Sevier CS, Kaiser CA. ERO1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et biophysica acta*, 2008, 1783:549-556

Seyfried TN, Glaser GH, Yu RK, Palayoor ST. Inherited convulsive disorders in mice. *Advances in neurology*, 1986;44:115-133

Shibata E, Ejima K, Nanri H, Toki N, Koyama C., Ikeda M, Kashimura M. Enhanced Protein Levels of Protein Thiol/Disulphide Oxidoreductases in Placentae from Pre-eclamptic subjects. *Placenta*, 2001, 22:566–572

Sideraki V, Gilbert HF. Mechanism of the antichaperone activity of protein disulfide isomerase: facilitated assembly of large, insoluble aggregates of denaturated lysozyme and PDI. *Biochemistry*, 2000, 39 : 1180-1188

Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 1993, 215, 213–219.

Sitia R, Molteni SN. Stress, protein (mis) folding and signaling: the redox connection. *Science STK*, 2004, 239:pe27

Simi A, Tsakiri N, Wang P, Rothwell NJ. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):1122-1126

Song JL, Wang CC. Chaperone-like activity of protein disulfide-isomerase in the refolding of rhodanese. *Eur J Biochem*, 1995, 231:312-316

Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain. *Prog Neurobiol* 1998;56:149-71

Stone TW, Addae JI. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. *Eur J Pharmacol* 2002;447:285-96

Storm DR. Mechanism of bacitracin action: a specific lipid-peptide interaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1974, 235(0):387-398

Tanaka S, Uehara T, Nomura Y. Up-regulation of protein disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(14) : 10388-10393

Tasanen K, Oikarinen J, Kivirikko K, Pihlajaniemi T. Promoter of the gene for the multifunctional protein disulfide isomerase polypeptide. *J. Biol. Chem.* 1992, 267:11513–11519

Tedesco FJ. Bacitracin therapy in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Digestive diseases and sciences*, 1980, 25(10):783-784

Townsend DM, Findlay VJ, Fazilev F, Ogle M, Fraser J, Saavedra JE, Ji X, Keefer LK, Tew KD. A glutathione S-transferase pi-activated prodrug causes kinase activation concurrent with S-glutathionylation of proteins. *Mol Pharmacol.* 2006;69(2):501-508

Townsend DM. S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Mol Interv.* 2007;7(6):313-324

Thompson DC, Perera K, Fisher R, Brendel K. Cresol isomers: comparison of toxic potency in rat liver slices. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1994, 125 (1):51-58

Truettner JS, Hu K, Liu CL, Dietrich WD, Hu B. Subcellular stress response and induction of molecular chaperones and folding proteins after transient global ischemia in rats. *Brain Res.* 2009;1249:9-18.

- Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukariotes : mechanisms and consequences. *The journal of cell biology*, 2004, 164(3) :341-346
- Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. S-nitrosylated protein disulfide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature*, 2006, 441(25):513-516
- Vamecq J, Maurois P, Bac P, Bailly F, Bernier JL, Stables JP, Husson I & Gressens P (2003) Potent mammalian cerebroprotection and neuronal cell death inhibition are afforded by a synthetic antioxidant analogue of marine invertebrate cell protectant othiols. *Eur J Neurosci* 18, 1110–1120.
- Weston BS, Wahab NA, Roberts T, Mason RM. Bacitracin inhibits fibronectin matrix assembly by mesangial cells in high glucose. *Kidney Int.* 2001;60(5):1756-1764
- Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1699 : 35-44
- Wilterdink JL, Bendixen B, Adams HP Jr, Woolson RF, Clarke WR, Hansen MD. Effect of prior aspirin use on stroke severity in the trial of Org 10172 in acute stroke treatment (TOAST). *Stroke.* 2001; 32(12):2836-2840
- Winter J, Klappa P, Freedman RB, Lillie H, Rudolph R. Catalytic activity and chaperone function of human protein-disulfide isomerase are required for the efficient refolding of proinsulin. *The Journal of biological chemistry*, 2002, 277(1):310-317
- Wiseman RL, Balch WE. A new pharmacology--drugging stressed folding pathways. *Trends Mol Med.* 2005;11(8):347-350
- White BC, Sullivan JM, DeGacia DJ, O'Neil BJ, Neumr RW, Grossman LI, Rafols JA, KrauseGS. Brain ischemia and reperfusion: Molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 2000, 179 : 1-33
- Xu J, Guo S. Retrospect on the research of the cultivation of *Gastrodia elata* Bl, a rare traditional Chinese medicine, 2000, 113(8) : 686-692
- Yang SH, Perez E, Cutright J, Liu R, He Z, Day AL, Simpkins JW. Testosterone increases neurotoxicity of glutamate in vitro and ischemia–reperfusion injury in an animal model. *J. Appl. Physiol.* 2002, 92 : 195–201.
- Yu SJ, Kim JR, Lee CK, Han JE, Lee JH, Kim HS, Hong JH, Kang SG. *Gastrodia elata* Blume and an active component, p-hydroxybenzyl alcohol reduce focal ischemic brain injury through antioxidant related gene expressions. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28(6) : 1016-1020
- Zaleska MM, Mercado ML, Chavez J, Feuerstein GZ, Pangalos MN, Wood A. The development of stroke therapeutics: Promising mechanisms and translational challenges. *Neuropharmacology*, 2009, 56(2):329-41.
- Zhang Z, Chopp M, Goussev A, Powers C. Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1998;784:210-7

Zhang Q, Yang YM, Yu GY. Effects of gastrodin injection on blood pressure and vasoactive substances in treatment of old patients with refractory hypertension: a randomized controlled trial. *Journal of Chinese integrative medicine*. 2008, 6(7) : 695-699

Zhou M, Jacob A, Ho N, Miksa M, Wu R, Maitra SR, Wang P. Downregulation of protein disulfide isomerase in sepsis and its role in tumor necrosis factor-alpha release. *Crit Care*. 2008;12(4):R100