



Ischémie cérébrale et interactions leucocyte-endothélium : modulation pharmacologique par les récepteurs nucléaires PPAR-alpha

Thavarak Ouk

► To cite this version:

Thavarak Ouk. Ischémie cérébrale et interactions leucocyte-endothélium : modulation pharmacologique par les récepteurs nucléaires PPAR-alpha. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT : . tel-00367341

HAL Id: tel-00367341

<https://theses.hal.science/tel-00367341>

Submitted on 11 Mar 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 : Pharmacologie

Présentée par

Thavarak Ouk

**Ischémie cérébrale et interactions leucocyte-endothélium : modulation
pharmacologique par les récepteurs nucléaires PPARs**

Directeur de Thèse : Régis Bordet

Soutenue le 12 février 2009

JURY

Vincent Richard

Rapporteur

Denis Vivien

Rapporteur

Catherine Heurteaux

Examineur

Bart Staels

Examineur

Régis Bordet

Directeur de thèse

Ce travail expérimental a été effectué dans le Laboratoire de Pharmacologie au sein de l'Equipe d'Accueil EA 1046 sous la responsabilité de Monsieur le Professeurs Régis Bordet.

Je remercie Monsieur le Docteur Vincent Richard et Monsieur le Professeur Denis Vivien 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.

Merci à Madame le Directeur de Recherche Catherine Heurteaux et Monsieur le Professeur Bart Staels d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

Régis,

Tu m'as fait confiance en me donnant l'opportunité de travailler dans ton équipe et de découvrir le monde de la recherche. Tu as réussi à me convaincre de poursuivre l'aventure malgré mes envies de « tranchées ». Je te remercie aussi pour ta patience car il en faut avec moi. Sois assuré de ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

Monsieur Caron, je tenais à vous remercier à travers ces quelques lignes pour vos compétences et conseils qui m'ont toujours été très précieux. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Maud, Olivier,

Vous êtes indissociables. Merci à tous les deux pour les bons moments passés au labo ou en dehors. Olivier, je me souviendrai toujours que tu m'as fait goûter aux joies de la vasomotricité et que tu m'as surtout fait partager ta passion pour la recherche. Maud, merci pour ton aide précieuse tout le long de cette longue thèse et d'avoir été là pour m'éviter de me disperser...

Sophie,

Pas facile de travailler avec moi. Je crois qu'on a au moins en commun d'être aussi organisé...Je te remercie pour ta disponibilité, ton dynamisme sans faille et ton aide précieuse tout le long et sur cette fin de thèse.

Cette thèse n'aurait pas la même saveur si elle n'avait pas été effectuée dans une ambiance chaleureuse et agréable. C'est avant tout un travail d'équipe. Je tiens à remercier Maud, Olivier, Sophie, Patrick, Michèle, Cédric, Elodie, Florent, Kévin, Fabrice pour leur aide et conseil.

Merci également à Bérangère, Jackie, Sabine et Nadine pour la bonne humeur au labo et leur disponibilité.

Aux trois autres Fantastiques,

Effectivement la chronique a été défrayée...La torche s'est bien mariée avec la femme invisible avec mon plus grand bonheur et celle de l'homme de pierre. On attend l'« antithèse » de la femme invisible pour clôturer l'histoire...

A mes parents et ma famille,

Pour qui je ne serai pas arrivé jusque là. J'ai tardé à tenir ma promesse mais cette fois-ci, promis je ne serai plus étudiant...

Tables des matières

INTRODUCTION.....	1
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	6
I. Les approches thérapeutiques des accidents vasculaires cérébraux : réalités et limites	7
I.A. Traitement préventif de la survenue et de la sévérité des AVC.....	7
I.A.1. Prévention primaire.....	7
I.A.2. Prévention secondaire	7
I.A.3. Le concept de neuroprotection préventive	8
I.B. La fibrinolyse	12
I.B.1. Principe.....	12
I.B.2. Agents pharmacologiques	12
I.C. Vingt ans de recherche d'agents neuroprotecteurs.....	14
I.C.1. Cibles de neuroprotection : évaluation pré-clinique et cliniques	15
I.C.2. Neuroprotection : les raisons d'un échec	21
II. Ischémie cérébrale : une pathologie de l'unité neurovasculaire.....	24
II.A. Les acteurs de l'unité neurovasculaire.....	24
II.A.1. Les neurones	24
II.A.2. La glie	25
II.A.3. L'endothélium.....	26
II.B. Les interactions	26
II.B.1. Anatomiques	26
II.B.2. Régulation du débit sanguin cérébral.....	27
II.B.3. Barrière hémato-encéphalique	27
II.B.4. Neurogénèse, angiogénèse et facteurs neurotrophiques	28
II.C. Les modifications au cours de l'ischémie cérébrale et des transformations hémorragiques	28

II.C.1. Découplage débit sanguin cérébral-métabolisme	30
II.C.2. Souffrance gliale et mort neuronale	31
II.C.3. Polynucléaires neutrophiles	32
II.C.4. Ischémie cérébrale et dysfonctionnement endothélial	33
II.C.5. Interaction neurovasculaire et complications hémorragiques	34
III. Les récepteurs nucléaires PPARs : une cible pléiotrope potentielle	36
III.A. Structure des récepteurs nucléaires PPARs.....	36
III.B. Mécanismes d'actions des PPARs.....	36
III.C. Distributions régionale et cellulaire des récepteurs PPARs	37
III.D. Rôle des récepteurs PPARs dans l'inflammation cérébrale	37
III.E. Les récepteurs PPAR- α	38
III.E.1. Les agonistes PPAR- α	38
III.E.2. Effets vasculaires de PPAR- α	38
III.E.3. PPAR- α et ischémie cérébrale	39
III.F. Les récepteurs PPAR- γ	40
III.F.1. Agonistes PPAR- γ	40
III.F.2. Effets vasculaires de PPAR- γ	40
III.F.3. PPAR- γ et ischémie cérébrale.....	40
III.G. Les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase : les statines	43
III.G.1. Les statines : un activateur indirect des récepteurs PPARs.....	43
III.G.2. Effets vasculaires des statines	43
III.G.3. Statines et ischémie cérébrale.....	44
PRESENTATION DU TRAVAIL.....	47
MATERIEL ET METHODES	50
I. Animaux.....	51
II. Méthodes	51
II.A. Modèle d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne	51

II.B. Paramètres physiologiques.....	53
II.C. Histomorphométrie	53
II.C.1. Prélèvement et coupes histologiques	53
II.C.2. Coloration	54
II.C.3. Quantification du volume de l'infarctus.....	54
II.C.4. Œdème cérébral	55
II.C.5. Quantification des complications hémorragiques.....	55
II.D. Méthode d'analyse de la fonction vasculaire cérébrale.....	55
II.D.1. Principe	55
II.D.3. Analyse de la réactivité vasculaire	58
II.E. Etude in vivo de la micro circulation cérébrale :	59
II.E.1. Préparation de la fenêtre crânienne d'observation.....	59
II.E.2. Evaluation de l'activation leucocytaire.....	60
II.E.3. Evaluation de la fonction endothéliale.....	61
II.F. Immunohistochimie.....	61
II.G. Autres paramètres	62
III. Protocoles expérimentaux	62
III.A. Substances pharmacologiques.....	62
III.B. Etude du rôle du polynucléaire neutrophile dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et des complications hémorragiques.....	64
III.C. Etude de la modulation des interactions leucocyte-endothélium par les récepteurs nucléaires PPAR- α	65
IV. Analyse statistique	65
RESULTATS	66
I. Rôle du polynucléaire neutrophile dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et des complications hémorragiques de la thrombolyse	67
I.A. Effet d'une déplétion et/ou d'une inactivation.....	67

I.A.1. Effet sur les lésions parenchymateuses et vasculaires	67
I.A.2. Effet sur les complications hémorragiques	69
I.B. Effet d'une activation de la lignée granulocytaire par le G-CSF	71
I.B.1. Effet sur les lésions parenchymateuses et vasculaires	71
II. Modulation pharmacologique des interactions leucocytes-endothélium par les récepteurs nucléaires PPARs dans l'ischémie cérébrale et les complications hémorragiques de la thrombolyse	77
II.A. Modulation par une approche préventive	77
II.A.1. Effets d'une modulation directe par le fénofibrate	77
II.A.1. Effets d'une modulation indirecte par l'atorvastatine	81
II.B. Modulation par une approche curative aiguë	83
II.B.2. Effets d'une modulation directe par le fénofibrate	83
II.B.3. Effets d'une modulation indirecte par l'atorvastatine	91
Article n°1	93
Article n°2	102
Article n°3	110
Article n°4	132
Article n°5	154
DISCUSSION	164
I. Rôle des interactions leucocyte-endothélium et ischémie cérébrale	166
I.A. Le polynucléaire neutrophile : un médiateur des conséquences neurovasculaires de l'ischémie ?	166
I.B. Rôle du polynucléaire dans la physiopathologie des complications hémorragiques de la thrombolyse	167
I.C. Dysfonction endothéliale : acteur ou marqueur ?	169
II. Les récepteurs nucléaires PPAR- α	170
II.A. Hypolipémiants, récepteurs PPAR et protection cérébrale	170
II.A.1. Neuroprotection préventive	170

II.A.2. Neuroprotection préventive par le fénofibrate : Préconditionnement ou effet aigu ?	172
II.A.3. Neuroprotection aiguë	172
II.B. Effet sur l'inflammation parenchymateuse et vasculaire	173
III. Perspectives cliniques et thérapeutiques	176
III.A. Protection préventive et hypolipémiants	176
III.B. Le polynucléaire neutrophile : un biomarqueur potentiel ?.....	177
III.C. Le fénofibrate en traitement aigu ?	178
ANNEXE	180
Article n°6	181
Article n°7	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	196

Liste des abréviations

$^{\circ}\text{OH}$	radical hydroxyle	rt-PA	activateur de plasminogène tissulaire
5-HT	sérotonine (5-hydroxytryptamine)	Sham	opération blanche
ACh	acétylcholine	SNP	nitroprussiate de sodium
ADMA	<i>asymetric dimethyl arginine</i>	SOD	superoxyde dismutase
AIT	accident ischémique transitoire	TLP	<i>thrombus lysis products</i>
AIC	accident ischémique constitué	TNF α	<i>tumor necrosis factor</i>
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxasol	t-PA	activateur de plasminogène tissulaire
APAF-1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>	VCAM	<i>vascular cell adhesion molecules</i>
AVC	accident vasculaire cérébral		
BHE	barrière hémato-encéphalique		
caspase	<i>cysteine aspartate, specific protease</i>		
CML	cellule musculaire lisse		
COX	cyclooxygénase		
DSC	débit sanguin cérébral		
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>		
GABA	acide γ aminobutyrique		
GMP	guanosine monophosphate		
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène		
I/R	ischémie/reperfusion		
ICAM	<i>intercellular cell adhesion molecules</i>		
IL	interleukine		
IRM	imagerie par résonnance magnétique		
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i>		
NF κ B	<i>nuclear factor κB</i>		
NMDA	N-méthyl-D-aspartate		
NO	monoxyde d'azote		
NOS	NO synthétase		
O ₂ $^{\bullet-}$	anion superoxyde		
ONOO $^-$	peroxynitrite		
PNN	polynucléaire neutrophile		
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>		
RLO	radicaux libres dérivés de l'oxygène		

INTRODUCTION

Les accidents vasculaires cérébraux sont responsables de 9% des décès dans le monde et sont la seconde cause de mortalité après les maladies coronaires (Donnan et al, 2008). La proportion des décès causés par les AVC est de 10-12 % dans les pays industrialisés, et 12 % de ces décès touchent des personnes âgés de moins de 65 ans. L'incidence de cette pathologie est d'environ 50-100 pour 100 000 personnes. Les accidents vasculaires cérébraux sont de deux types : les accidents ischémiques qui représentent 80% des AVC sur lesquels se focalisera cette thèse ; les accidents hémorragiques qui représentent 20% des AVC et correspondent à une extravasation de sang dans le parenchyme cérébral responsable d'une compression et d'une destruction du tissu nerveux. L'ischémie cérébrale correspond à une interruption du flux sanguin cérébral dans un des territoires artériels cérébraux soit carotidien ou vertébro-basilaire. L'accident ischémique cérébral peut être transitoire (accident ischémique transitoire, AIT) lorsque le flux sanguin est rapidement restauré évitant que les lésions irréversibles ne s'installent et que les symptômes cliniques se pérennisent. Si l'interruption du flux sanguin se prolonge, la baisse du débit sanguin cérébral conduit à des lésions cérébrales constituées (accidents ischémiques constitués ou AIC) et à des symptômes cliniques persistants dont la séméiologie correspond au territoire vasculaire atteint. Les causes d'interruption du flux sanguin sont nombreuses qu'il s'agisse d'une thrombose sur des lésions athéromateuses, d'une embolie d'origine cardiaque, d'une lésion lacunaire par atteinte des petites artères ou d'une dissection artérielle. L'accident ischémique est un processus dynamique, tant au plan cinétique que spatial, qui évolue sur plusieurs semaines voire plusieurs mois, même si la phase aiguë constitue le moment crucial pour le diagnostic positif et étiologique, pour la mise en jeu des processus physiopathologiques et la prise en charge thérapeutique.

Depuis le développement et la généralisation des techniques modernes d'imagerie, scanner puis IRM, le diagnostic positif et topographique des accidents vasculaires ischémiques pose de moins en moins de problème. L'IRM dans ces aspects de perfusion et de diffusion, permet dès les premières heures de survenue d'un accident ischémique d'authentifier à la fois la baisse du débit sanguin dans un territoire donné (IRM de perfusion) et son retentissement au plan lésionnel (IRM de diffusion). Du point de vue étiologique, même si un pourcentage non négligeable (en particulier chez les sujets jeunes) d'accidents ischémiques reste inexpliqué, les critères TOAST permettent de classer les accidents ischémiques en quatre grandes cadres étiologiques : accidents d'origine athéromateuse ; accidents d'origine cardio-embolique ; accidents lacunaires ; accidents ischémiques liés une dissection artérielle. De plus, les facteurs de risque vasculaire ou métabolique ont été bien identifiés : (i) facteurs clairement associés à un risque d'accident ischémique (hypertension artérielle, tabagisme, âge, diabète,...) ; (ii) facteurs

probablement associés à un risque accru (dyslipidémie,...) (Leys et al, 2002). Si les aspects diagnostiques semblent bien étayés, deux autres aspects des accidents ischémiques restent à approfondir : les mécanismes physiopathologiques ; les approches pharmacologiques et thérapeutiques.

Au plan physiopathologique, la mise au point de modèles expérimentaux, *in vitro* ou *in vivo*, a permis de mieux comprendre les voies moléculaires conduisant à la mort neuronale par nécrose ou apoptose, avec une modélisation à la fois spatiale et cinétique des principaux mécanismes mis en jeu : excitotoxicité ; dépolarisation neuronale ; stress oxydant ; inflammation ; activation des caspases (Dirnagl et al, 1999). On distingue habituellement : (i) le cœur de l'ischémie où les lésions, en particulier nécrotiques, s'installent rapidement sous l'effet de l'excitotoxicité et de la dépolarisation neuronale ; (ii) la zone de pénombre où la baisse du débit sanguin cérébral est moindre et où les neurones restent viables plus longtemps (Hossman, 1994). C'est dans la zone de pénombre que dans les heures et jours qui suivent le début de l'ischémie que s'installent les mécanismes oxydants et inflammatoires conduisant à la mort par apoptose mais aussi par nécrose. Cette hétérogénéité spatiale est visualisée en IRM par le décalage entre les lésions de diffusion et les lésions de perfusion. Plus longtemps le flux sanguin est interrompu, puis 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. Au plan cellulaire, tous ces mécanismes ont été principalement décrits à l'échelon neuronal, même si le rôle des cellules gliales et de la paroi vasculaire a été plus récemment reconnu. Au plan glial, il est clair que les astrocytes s'activent au cours du processus ischémique et que cette activation contribue aux mécanismes d'excitotoxicité, de stress oxydant et d'anomalies ioniques (Panickar and Norenberg, 2005). L'inflammation qui s'installe dans le foyer ischémique est en partie le résultat d'une activation des cellules microgliales. La reconnaissance du rôle du vaisseau, tant de la paroi vasculaire que des éléments figurés du sang, est plus récente mais il est établi que l'activation, l'adhésion et l'infiltration des polynucléaires neutrophiles jouent un rôle crucial dans la constitution des lésions parenchymateuses et que la dysfonction endothéliale et l'accumulation artériolaire des polynucléaires neutrophiles et des plaquettes constituent une limite de la reperfusion, pérennisant le processus ischémique (Wang et al, 2007 ; Del Zoppo, 2008).

Plusieurs revues de synthèse ont permis de conclure que la prochaine étape dans la compréhension de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale nécessitait d'avoir une vision intégrée de l'ensemble des mécanismes à l'échelon de l'unité neurovasculaire, en mettant en lumière les relations mécanistiques entre les trois compartiments cellulaires (Lo et al, 2003 ; Del

Zoppo, 2006 ; Lo, 2008). Les recherches sur le phénomène de préconditionnement cérébral ont également permis de faire émerger la notion de mécanismes protecteurs endogènes dont l'effet est complété par la mobilisation des cellules souches d'origine cérébrale ou hématopoïétique, qui permet une migration et une différenciation de nouvelles cellules dans le foyer ischémique. Ces mécanismes endogènes qui viennent limiter les conséquences de l'ischémie nécessitent également une coopération entre les différents compartiments de l'unité neurovasculaire. L'enjeu est donc de mieux comprendre comment les différents acteurs de l'unité neurovasculaire coopèrent en condition ischémique pour mettre en jeu des mécanismes délétères mais aussi protecteurs dont le résultat est une plus ou moins grande extension des lésions ischémiques. Une meilleure connaissance physiopathologique est aussi une contribution à l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques.

Au plan thérapeutique, des progrès indéniables ont été faits dont témoignent une diminution progressive, au cours des deux dernières décennies, de l'incidence mais aussi de la sévérité des accidents ischémiques cérébraux. Le traitement préventif est en grande partie responsable de cet état de fait. L'effet préventif de la baisse de la pression artérielle ou de la prise d'un hypolipémiant a été établi par de larges études de morbi-mortalité avec un niveau de preuve important. Des résultats plus récents établissent qu'au delà de ces effets préventifs, la prise de certains de ces traitements pourrait être associée à une moindre sévérité des accidents quand ils surviennent en dépit de la prévention (Deplanque et al, 2006). En effet, si le traitement préventif est efficace, il ne prévient qu'une partie des accidents ischémiques rendant nécessaire le développement de stratégies thérapeutiques à la phase aiguë ou pour accélérer la récupération fonctionnelle. Le seul traitement ayant une utilisation validée est la fibrinolyse, applicable dans les 4h30 (Hacke et al, 2008) qui suivent le début de l'accident ischémique, mais qui nécessite le développement de nouveaux agents fibrinolytiques ou le recours à des traitements adjuvants permettant de limiter le risque hémorragique d'une fibrinolyse administrée au delà du délai recommandé. Ces traitements adjuvants pourraient aussi être des agents neuroprotecteurs dont la recherche a débuté dans les années 1980 mais qui reste aujourd'hui infructueuse en dépit des nombreuses molécules testées tant au plan expérimental que clinique depuis une vingtaine d'années. Ces échecs répétés conduisent aujourd'hui à développer des stratégies pharmacologiques aux mécanismes pléiotropes et ciblant l'ensemble de l'unité neurovasculaire. Les travaux menés sur les mécanismes protecteurs endogènes et sur les phénomènes de plasticité cérébrale conduisent à tester de nouvelles approches de la récupération fonctionnelle ou de la réparation cérébrale post-ischémique, avec des essais de thérapie cellulaire.

Ce travail de thèse s'est inscrit dans ce contexte, en abordant plusieurs points : (i) le rôle du polynucléaire neutrophile comme un des médiateurs physiopathologique au sein de l'unité neurovasculaire ; (ii) la recherche de cibles pour un traitement adjuvant de la thrombolyse ; (iii) la caractérisation du récepteur PPAR- α comme cible pharmacologique potentielle ayant une action pléiotrope et pouvant être utilisée comme cible dans la neuroprotection préventive, la neuroprotection aiguë et le traitement adjuvant de la fibrinolyse sous l'effet de deux classes d'agents hypolipémians (fibrates et statines). Avant de développer les résultats obtenus, seront abordés les données bibliographiques concernant trois aspects particuliers : (i) les approches pharmacologiques actuelles des accidents ischémiques cérébraux ; (ii) l'intrication des mécanismes physiopathologiques au sein de l'unité neurovasculaire ; (iii) la pharmacologie des récepteurs PPARs et leur implication dans l'ischémie cérébrale.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Les approches thérapeutiques des accidents vasculaires cérébraux : réalités et limites

I.A. Traitement préventif de la survenue et de la sévérité des AVC

Bien que leur incidence et même leur mortalité aient connu une diminution remarquable depuis ces trente dernières années, les accidents vasculaires cérébraux demeurent fréquents et graves. De plus, 50 % des sujets ayant eu un accident vasculaire cérébral gardent un handicap physique ou intellectuel permanent. Un élément essentiel de la lutte contre les AVC est la prévention puisque les ressources thérapeutiques à la phase aiguë de l'accident sont actuellement des plus limitées.

I.A.1. Prévention primaire

La prévention s'est essentiellement développée dans les vingt dernières années avec la réalisation d'études de cohortes et des essais thérapeutiques qui demeurent le meilleur outil pour étudier l'impact des thérapeutiques préventives. 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 sera basé sur le dépistage et le traitement des facteurs de risque pour tenter de prévenir la formation de la plaque d'athérome. Cette procédure est d'autant plus efficace que ces mesures de prévention primaire sont mises en œuvre le plus précocement possible. L'importante réduction de la mortalité consécutive aux AVC est largement attribuable à l'amélioration du contrôle des facteurs de risque et en particulier l'hypertension artérielle. Le contrôle des autres facteurs de risques tels que le cholestérol, le diabète, la fibrillation auriculaire et la réduction de la consommation de tabac peut avoir également un impact considérable dans la prévention des AVC.

I.A.2. Prévention secondaire

La prévention des récurrences d'AVC a été une des avancées majeures dans la prise en charge des AVC durant ces 30 dernières années. En 1977, il n'existait aucune stratégie de prévention secondaire dans l'ischémie cérébrale. L'aspirine a été introduite en 1978, aspirine plus dipyridamole en 1987, la warfarine pour les patients souffrant de fibrillation auriculaire en

1993, endartérectomie carotidienne pour les sténoses de l'artère carotidienne en 1991, le clopidogrel en 1996, la réduction de la pression sanguine avec le perindopril, l'indapamide ou le ramipril en 2001 et la réduction du cholestérol avec l'atorvastatine en 2006. Un important arsenal thérapeutique est dorénavant disponible dans la prévention secondaire des AVC.

L'utilisation des traitements antithrombotiques (aspirine et antiplaquettaires) 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.

Le lien entre cholestérol et AVC est complexe, le rôle de l'hypercholestérolémie comme facteur de risque étant resté longtemps controversé, plusieurs études longitudinales n'ayant pas clairement établi de lien entre la survenue d'un AVC et l'existence d'une hypercholestérolémie. De fait, des études récentes ont ainsi pu démontrer l'existence d'un lien entre augmentation du cholestérol total, augmentation du LDL-cholesterol, diminution du HDL-cholesterol d'une part et augmentation du risque de survenue d'un accident ischémique cérébral. Ce lien, parallèle à celui démontré pour la pathologie coronarienne aiguë, sous-tend l'étude des effets, en prévention secondaire et/ou primaire, des agents hypolipémiants, en particulier des statines, dans la pathologie ischémique cérébrale, dans le but de démontrer que leur prescription peut prévenir la survenue des AVC comme elle le fait pour la survenue des accidents coronariens aigus.

I.A.3. Le concept de neuroprotection préventive

L'ischémie cérébrale se caractérise par la mise en jeu de voies moléculaires complexes qui aboutissent à la mort neuronale. Mais, en dehors de ces processus délétères, apparaissent également des mécanismes endogènes qui visent à protéger le cerveau vis-à-vis de l'agression ischémique. Ces phénomènes adaptatifs peuvent être déclenchés, par anticipation, avant même le début de l'ischémie sous forme d'une réponse coordonnée à l'échelon génomique, moléculaire, cellulaire et tissulaire qui concourt à induire une résistance à l'ischémie. Le concept de

préconditionnement recouvre l'ensemble des stratégies expérimentales qui consistent à induire un phénotype protecteur avant que le stress ischémique ne survienne. Le phénomène de preconditionnement se caractérise par deux phases : une phase précoce dans les heures qui suivent l'application de la procédure preconditionnante ; une phase tardive de protection mais plus durable qui survient après un intervalle libre de 24 à 48 heures et qui est souvent maximale 72 heures après le preconditionnement.

Le preconditionnement ischémique correspond à des périodes d'ischémies brèves, incapables par elles-mêmes d'entraîner de lésions cérébrales mais qui, appliquées avant une ischémie prolongée, en diminuent le volume. Plusieurs études ont démontré l'existence d'une résistance cérébrale à l'ischémie après réalisation d'un preconditionnement ischémique dans des modèles globaux ou focaux d'ischémie (Hawaleshka et Jacobsohn, 1998). En dehors du preconditionnement cérébral ischémique, d'autres stimuli peuvent également induire une résistance à l'ischémie : le stress thermique ; la « cortical spreading depression » ; le preconditionnement pharmacologique (Rejdak et al, 2001; Kobayashi et al, 1995). Concernant le preconditionnement pharmacologique, différentes substances, toxiques pour le cerveau à forte dose, peuvent induire une résistance cérébrale à l'ischémie lorsqu'elles sont utilisées à des doses 5 à 20 fois inférieures. L'administration d'une faible dose d'endotoxine bactérienne, le lipopolysaccharide, ou d'une faible dose d'acide 3-nitropropionique sont capables de réduire les tailles d'infarctus dans différents modèles expérimentaux d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (Bordet et al, 2000; Wiegand et al, 1999). L'administration de thrombine ou d'acide linoléénique, un acide gras polyinsaturé, sont également capables d'induire une résistance cérébrale à l'ischémie (Jiang et al, 2002; Blondeau et al, 2001).

Cette programmation génomique de la résistance à l'ischémie vise à : (i) activer des voies moléculaires qui confèrent des mécanismes de défenses endogènes vis-à-vis de l'agression ischémique ; (ii) prévenir, par leur répression génique, l'activation des voies moléculaires qui jouent, au cours de l'ischémie, un rôle essentiel dans l'induction de la mort neuronale nécrotique ou apoptotique d'origine ischémique (Dirnagl et al, 2003). L'expression génomique observée chez un animal preconditionné soumis à une ischémie va être très différent de celui des animaux soumis seulement à un preconditionnement ou à une ischémie. Après un preconditionnement, est observée une augmentation de l'expression des molécules endogènes qui sont susceptibles de protéger les cellules cérébrales. En cas d'ischémie, chez un animal preconditionné, les mécanismes délétères (excitotoxicité, stress oxydant, inflammation, apoptose) sont moins exprimés ou actifs. Ceci s'explique par la mise en jeu de multiples effecteurs qui incluent des protéines de structure ou de fonction de la membrane cellulaire, du cytosquelette, de la

mitochondrie ou des organites impliqués dans le métabolisme cellulaire. On peut distinguer deux types d'effecteurs : (i) ceux qui sont le résultat d'une programmation génomique des fonctions de survie (protéines anti-apoptotiques type Bcl-2, UCP-2, IAP ou inhibiteurs of apoptosis proteins, enzymes de réparation de l'ADN, gènes de survie, enzymes anti-oxydantes, facteurs neurotrophiques et de croissance, érythropoïétine, protéines chaperone de type protéines de choc thermique...); (ii) ceux qui résultent d'une programmation génomique de l'inhibition des phénomène de mort cellulaire (protéines pro-apoptotiques type Bax, cytochrome c et AIF, facteurs de transcriptions pro-inflammatoires type NFκB, enzymes de production de radicaux libres, endonucléases, p53, c-jun...).

Si le préconditionnement a été longtemps considéré comme un mécanisme essentiellement neuronal, il est maintenant reconnu comme un phénomène de protection globale des trois compartiments de l'unité neurovasculaire. Les mécanismes précédemment cités ont été souvent décrits à l'échelon neuronal et le préconditionnement induit également une augmentation de la neurogenèse. Cependant l'induction optimale d'une résistance à l'ischémie nécessite une réponse intégrée de l'unité neurovasculaire. Il est, en effet, impossible de s'affranchir des anomalies vasculaires consécutives à l'ischémie et de l'infiltration du foyer par des éléments figurés du sang, notamment les polynucléaires neutrophiles, qui pénètrent dans le cerveau via des protéines d'adhésion vasculaires. De même, des molécules synthétisées par les astrocytes, comme l'érythropoïétine, sont en jeu dans la protection neuronale au cours du préconditionnement. De fait, dans des conditions de préconditionnement, une protection vasculaire et une protection gliale ont été également décrites. Au niveau vasculaire, le préconditionnement permet de limiter les interactions leucocytes-endothélium, par l'intermédiaire d'une moindre induction des protéines d'adhésion et une augmentation de l'expression de la NO synthase de type 3. Ces modifications ont pour conséquence, après un préconditionnement, de préserver la fonction endothéliale avec pour conséquence un maintien du débit sanguin cérébral et des capacités d'angiogenèse. Les astrocytes et les cellules microgliales sont transitoirement activés par le préconditionnement, ce qui traduit leur implication mais le préconditionnement prévient également leur activation massive et délétère après l'induction d'une ischémie. Les mécanismes impliquant les cellules gliales au cours du préconditionnement sont nombreux : mouvements ioniques, transfert de substrats énergétiques, métabolisme des neurotransmetteurs, maintien de la structure et des fonctions de la BHE, piégeage des radicaux libres, production de facteurs de croissance et d'érythropoïétine, libération de cytokines anti-inflammatoires (IL-10), synthèse de protéines de choc thermique (Trendelenburg and Dirnagl, 2005).

L'ensemble des mécanismes impliqués dans l'induction d'une résistance à l'ischémie de l'unité neurovasculaire constitue, du point de vue théorique, un ensemble de cibles pharmacologiques susceptibles d'induire une neuroprotection préventive, puisque dans le modèle fondamental de préconditionnement, leur mise en jeu préalable à l'ischémie permet une reprogrammation génomique vers un phénotype protecteur. Néanmoins, une preuve de la pertinence clinique du préconditionnement cérébral devait être apportée avant d'envisager une recherche translationnelle vers des médicaments pouvant mimer ce phénomène expérimental. Ceci a été apporté par la démonstration que les patients ayant présenté un accident ischémique transitoire, situation clinique mimant un préconditionnement ischémique, avait une sévérité moindre pour les accidents ischémiques constitués qu'ils faisaient au décours et même très à distance de l'accident ischémique transitoire (Wegener et al, 2004).

Dans la continuité des travaux sur le préconditionnement, l'effet neuroprotecteur préventif de classes médicamenteuses utilisées dans la prévention primaire ou secondaire des accidents ischémiques cérébraux a été tenté. Une série de travaux ont permis de montrer que l'administration préventive de différentes statines induisait une réduction de la taille d'infarctus dans des modèles expérimentaux, en association à une augmentation de l'expression de la NOS endothéliale et à un effet anti-oxydant. Les antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine 2 (sartans) ont également été décrits pour avoir des effets similaires, en modulant des voies impliquées dans le phénomène de préconditionnement cérébral. La classe des fibrates a été également étudiée avec la mise en évidence d'un effet identique. Au delà des médicaments, l'exercice physique induit également un effet neuroprotecteur préventif. Des résultats expérimentaux complémentaires sont venus démontrer que l'effet de ces différentes classes, en particulier des statines, ne persistait pas à un arrêt de quelques jours avant la réalisation de l'ischémie, suggérant que l'effet neuroprotecteur préventif n'est pas liée à un mécanisme de préconditionnement mais plus à la présence du médicament dans l'organisme au moment de la survenue de l'accident ischémique cérébral. Il n'en demeure pas moins que quelque soit le mécanisme en jeu, la neuroprotection préventive reste cliniquement pertinent puisque plusieurs études cliniques ont permis de montrer que les patients traités par des agents hypolipémiants ou pratiquant l'exercice physique régulier avant la survenue d'un accident ischémique cérébral ont une sévérité moindre des conséquences cliniques (Deplanque et al, 2006).

I.B. La fibrinolyse

Les progrès réalisés dans le diagnostic et dans la connaissance de la physiopathologie des infarctus cérébraux ont abouti à des traitements efficaces dans la prévention primaire et secondaire. En revanche, 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.

I.B.1. Principe

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.

I.B.2. Agents pharmacologiques

Les fibrinolytiques sont des molécules capables de promouvoir la conversion du plasminogène en plasmine. Plusieurs molécules fibrinolytiques, efficaces dans la recanalisation des artères coronaires au cours de l'ischémie myocardique, ont été évaluées dans l'ischémie cérébrale : streptokinase, rtPA ou altéplase, urokinase, rétéplase, ténecteplase desmotéplase. Toutefois, les résultats cliniques n'ont pas tous été encourageants à la phase aiguë de l'infarctus cérébral et des différences d'efficacité ont été observées entre les agents fibrinolytiques, contrastant avec les résultats dans l'ischémie myocardique. Ces différences pourraient être expliquées en partie par les différences entre les mécanismes thrombotiques impliqués dans l'ischémie myocardique et l'ischémie cérébrale. En cas d'ischémie myocardique, le thrombus responsable de l'occlusion artérielle est le plus souvent formé à partir d'agrégats fibrino-plaquettaires, originaires d'une plaque d'athérome ulcérée. Les étiologies de l'ischémie cérébrale sont plus diverses et par conséquent, la composition du thrombus au cours de l'ischémie cérébrale peut être variable selon le mécanisme étiologique (Amarenco, 2001). Ainsi, l'effet de la fibrinolyse pourrait varier de manière importante selon la teneur en fibrine du thrombus (del Zoppo et al, 1990), ce qui justifie l'évaluation, dans l'infarctus cérébral, d'agents fibrinolytiques avec une fibrinospécificité variable, sans toutefois savoir si cette fibrinospécificité peut expliquer la variabilité des résultats en terme d'efficacité de la fibrinolyse. La desmotéplase était une molécule prometteuse en raison d'une demi-vie plus longue (>4 heures) que le t-PA (5-10 min). De plus elle présentait l'avantage par rapport au t-PA de ne pas présenter d'effet neurotoxique

(Lopez-Atalaya et al, 2007). Néanmoins une étude clinique de phase III de la desmotéplase a été interrompue puisqu'elle n'a pu pas montré d'effets bénéfiques en terme d'amélioration neurologique et de survie.

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. Cette glycoprotéine est identique au tPA humain endogène et en partage les mêmes propriétés fibrinolytiques. Elle ne peut activer le plasminogène qu'en présence de fibrine, ce qui lui confère une spécificité d'action sur le caillot constitué. Toutefois, à forte posologie, cette spécificité semble disparaître avec l'apparition d'une action au niveau du fibrinogène circulant. Toutes les études avec le rtPA soulignent les deux limites majeures à son utilisation au cours de l'ischémie cérébrale : étroitesse de la fenêtre thérapeutique et risque hémorragique. Ces facteurs limitants, qui sont peut-être liés, ont conduit à restreindre l'utilisation du rtPA et à proposer des recommandations concernant les caractéristiques des patients susceptibles de bénéficier d'une fibrinolyse.

La survenue d'une hémorragie cérébrale constitue la principale complication du traitement par rtPA lors de son utilisation dans l'ischémie cérébrale, avec une incidence presque dix fois supérieure à celle des complications hémorragiques intracérébrales observées lors de la thrombolyse cardiaque (Gurwitz et al, 1998). A partir des essais cliniques dans l'indication cérébrale, une relation a initialement été établie entre l'importance de cette incidence et le délai avec lequel la fibrinolyse était instaurée (Wardlaw, 2001). Cependant, la comparaison des résultats de l'étude NINDS, réalisée dans un délai de moins de 3 heures et des autres études où la fibrinolyse était effectuée dans un délai de 6 heures, montre une incidence équivalente (de l'ordre de 6%) de complications hémorragiques intracérébrales, entretenant la controverse sur le délai de prise en charge des AVC par rtPA (Ringleb et al, 2002). En outre, dans les études de phase IV, toutes réalisées chez des patients traités par rtPA dans un délai de 3 heures, la fréquence des complications hémorragiques varie de 3,3 à 15,7% (Deplanque et al, 2003). Le non-respect des recommandations d'utilisation du rtPA ne peut expliquer à lui seul cette variabilité de survenue. Plusieurs facteurs cliniques favorisant sont effectivement identifiés : l'âge (Larrue et al, 1997; Kent et al, 2005), l'existence d'une hypertension artérielle, le diabète (Larrue et al, 2001), l'ethnie (Broderick et al, 1997; Gurwitz et al, 1998) ou encore la dose de rtPA administrée (Gurwitz et al, 1998; Levy et al, 1994). D'autres facteurs, radiologiques (existence à l'IRM cérébrale de modifications précoces des séquences de diffusion et de perfusion) et biologiques (taux de plaquettes circulant, taux de métalloprotéinase 9 plasmatique, taux des inhibiteurs spécifiques de la fibrinolyse) sont également prédictifs de la survenue d'une hémorragie

intracérébrale après la fibrinolyse (Alexandrov et al, 1997; Tanne et al, 2002; Castellanos et al, 2003; Montaner et al, 2003; Ribo et al, 2004).

Une méta-analyse de 17 essais de fibrinolyse cérébrale ayant utilisé différents types d'agents thrombolytiques et concernant 5216 malades a permis de montrer une surmortalité chez les patients traités par fibrinolyse en raison d'une forte augmentation du risque d'hémorragie cérébrale symptomatique. Lorsque l'analyse ne porte que sur les survivants, le risque d'invalidité est cependant moindre chez les patients traités. Cet effet bénéfique est plus important pour les patients traités par le rt-PA dans un délai de 3 heures, en dépit d'un risque hémorragique qui reste élevé. Le rt-PA administré dans les 3 heures à la posologie de 0,9 mg/kg permet de réduire la proportion de patients morts ou dépendants à 3 mois, avec 14 décès ou dépendances évités lorsque 100 patients sont traités. Tout récemment l'étude ECASS 3 avait pour but d'évaluer l'efficacité et la sécurité d'emploi du rtPA 3h à 4h30 après le début de l'ischémie. Les résultats probants de cette étude a permis d'étendre la fenêtre thérapeutique du rtPA à 4h30 (Hacke et al, 2008).

I.C. Vingt ans de recherche d'agents neuroprotecteurs

Même si le concept de neuroprotection vis-à-vis des lésions ischémiques est né au cours des années 1980 avec les premières recherches sur la physiopathologie de l'ischémie cérébrale, c'est au début des années 1990 que la recherche sur la neuroprotection a vraiment émergé comme l'atteste l'afflux de publications référencées. Au cours des six dernières années, 1000 articles expérimentaux et 400 articles cliniques ont été publiés dans ce domaine. La neuroprotection peut être définie comme une stratégie ou une combinaison de stratégies qui peut inhiber, interrompre ou ralentir les événements moléculaires et cellulaires qui conduisent à des lésions ischémiques irréversibles, excluant les thérapeutiques visant à agir directement sur l'obstruction artérielle elle-même (Ginsberg, 2008). S'appuyant sur des modèles expérimentaux reproduisant la pathologie vasculaire cérébrale et sur les nombreux mécanismes physiopathologiques mis en évidence (excitotoxicité, dépolarisation péri-infarctus, stress oxydant, inflammation, activation des caspases,...), de nombreux agents neuroprotecteurs ont été évalués tant au plan pré-clinique que clinique. Les échecs répétés des différents molécules ont conduit à remettre en question la pertinence de la stratégie, des modèles pré-cliniques ou de l'évaluation clinique. Si les recommandations STAIR pour l'évaluation pré-clinique ont permis d'améliorer certaines étapes du développement, un effort doit être encore fait sur les étapes

translationnelles (Feuerstein et al, 2008), avec notamment la prise en compte de l'évolution cinétique et spatiale de la cible testée, afin de mieux sélectionner les patients. Plus généralement, ces échecs ont conduit à réfléchir à des stratégies ciblant les mécanismes physiopathologiques de façon plus intégrée ou à l'aide d'agents pharmacologiques à l'action pléiotrope.

I.C.1. Cibles de neuroprotection : évaluation pré-clinique et cliniques

Les lésions du tissu cérébral et vasculaire consécutives à l'ischémie sont la résultante de nombreux mécanismes intriqués et évolutifs dans le temps et dans leur localisation. On assiste ainsi à un phénomène de maturation de l'ischémie, avec très rapidement après la baisse du DSC, des mécanismes d'excitotoxicité et de dépolarisation péri-infarctus qui endommagent irréversiblement les neurones et les cellules gliales au sein du cœur ischémique. Dans la zone de pénombre avoisinante, d'autres mécanismes se mettent en place, sous la forme d'un stress oxydant, puis plus tardivement de processus inflammatoires et apoptotiques (figure 1).

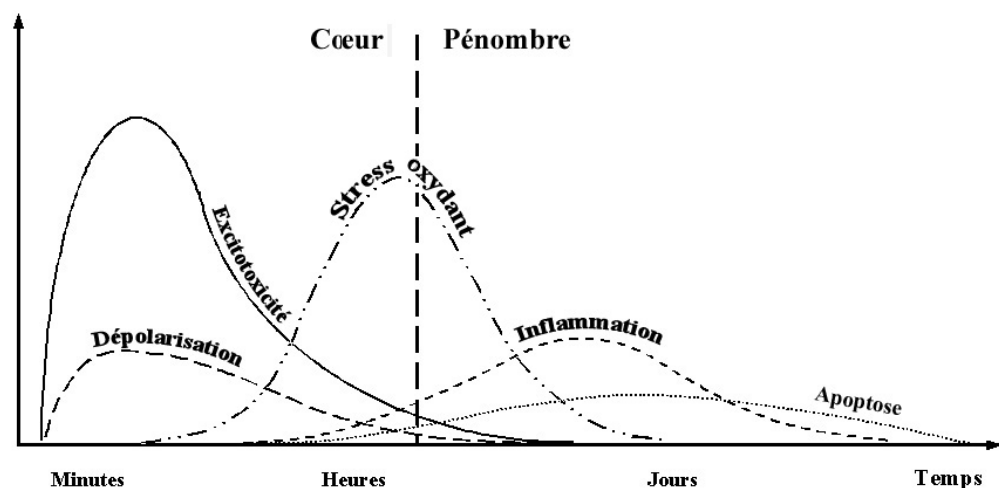


Figure 1 : Cinétique des mécanismes impliqués dans l'ischémie cérébrale (d'après Dirnagl, 1999)

I.C.1.a. Excitotoxicité et dépolarisation péri-infarctus

Mécanismes

Le calcium constitue l'un des principaux seconds messagers au sein des cellules neuronales. Il est impliqué dans les mécanismes de libération des neurotransmetteurs, dans l'excitabilité membranaire et dans la modulation de nombreux processus métaboliques (Kristiàn et Siesjö, 1998). Le maintien d'une faible concentration cytosolique en calcium, alors que le milieu extracellulaire est environ 10 000 fois plus concentré que le milieu intracellulaire, s'effectue, dans les conditions physiologiques, par la mise en jeu de différents systèmes dont le fonctionnement est coûteux en énergie : stockage intracellulaire par l'activation des transporteurs

Ca^{2+} ATPase et des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ au niveau du réticulum endoplasmique ou des mitochondries et/ou efflux par les transporteurs membranaires Ca^{2+} -ATPase et Na^+/K^+ ATPase en parallèle de l'échange passif par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Neumar, 2000). La déplétion énergétique induite par l'ischémie cérébrale va brusquement interrompre la régulation de cette homéostasie calcique, avec la saturation rapide des différents systèmes de stockages et d'efflux. 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 par l'isoforme neuronale de la NO synthase. Cette augmentation du calcium intracellulaire est majorée secondairement, 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). 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) (figure 2).

L'entrée massive de cations dans l'espace intracellulaire conduit à une dépolarisation membranaire se transmettant aux neurones excitateurs qui relarguent 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 peri-infarctus correspond à la propagation, dans le tissu cérébral, de ces dépolarisations membranaires répétées (Hossman, 1994), qui semblent pouvoir se répéter plusieurs fois par heure et ce de manière prolongée (Dirnagl et al, 1999) avec un effet délétère sur le parenchyme cérébral dans la mesure où, chez l'animal, 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 cytotoxique (Ayata et Ropper, 2002).

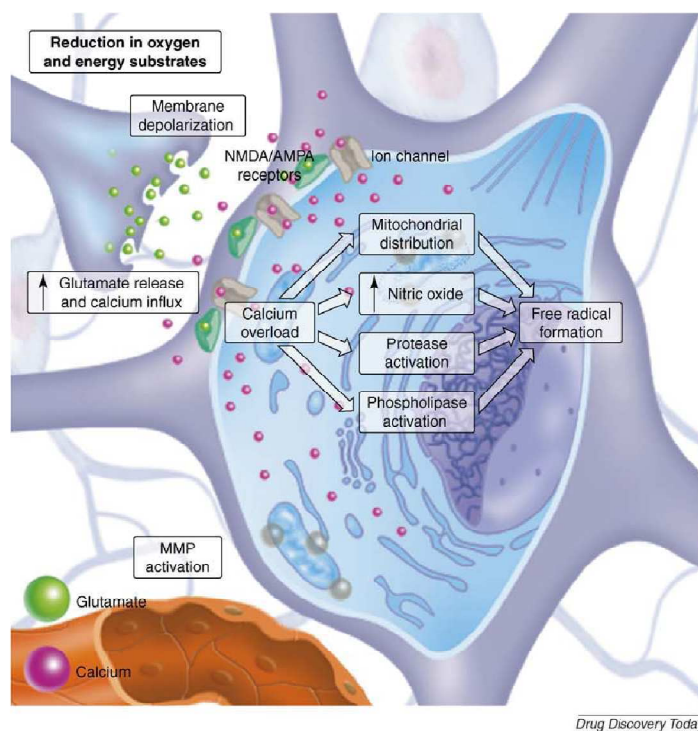


Figure 2 : Cascade ischémique initiale (d'après Green et Shuaib, 2006)

Agents neuroprotecteurs évalués en clinique

Inhibiteurs calciques : la nimodipine

Le calcium joue un rôle central dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. Le blocage des canaux calciques (de type L) au niveau cérébral permettrait de réduire l'entrée de calcium à l'intérieur des neurones. La nimodipine est une 1,4-dihydropyridine qui exerce un effet neuronal et de plus un effet vasodilatateur préférentiellement au niveau cérébral.

Environ 3 400 patients ont été inclus sur 5 essais cliniques. L'initiation du traitement pour quatre de ces études s'est faite dans les 24 ou 48 heures après le début de l'ischémie, bien au-delà de la fenêtre thérapeutique expliquant leur échec. De plus les données précliniques sur la nimodipine ont montré une neuroprotection limitée et inconstante.

Antagonistes glutamatergiques

Il est bien établi que le glutamate est le principal neuromédiateur excitateur, capable d'induire des effets excitotoxiques. Le glutamate interagit avec de nombreuses classe de récepteurs qui sont pertinentes dans la neuroprotection : les récepteurs NMDA et AMPA.

Antagonistes compétitifs des canaux NMDA

Des études précliniques, il ressortait que ces antagonistes devaient être administré très tôt pour être efficace. Les échecs des essais cliniques pouvaient s'expliquer par le fait

que le traitement était administré trop tardivement. Seul le Seftogel a été évalué en clinique. Les essais ont été interrompus en raison d'une plus grande mortalité dans le groupe traité.

Antagoniste du site de la glycine du récepteur NMDA : gavestinel

Les essais cliniques pour cette molécule ont été conduites de manière exemplaire mais ce sont les études précliniques qui étaient de qualité sub-optimale.

I.C.1.b. Stress oxydant

Mécanismes

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). Cette production est par ailleurs majorée par la reperfusion (Hallenbeck et Dutka, 1990). Les principales espèces générées sont : l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$, 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 (figure 3).

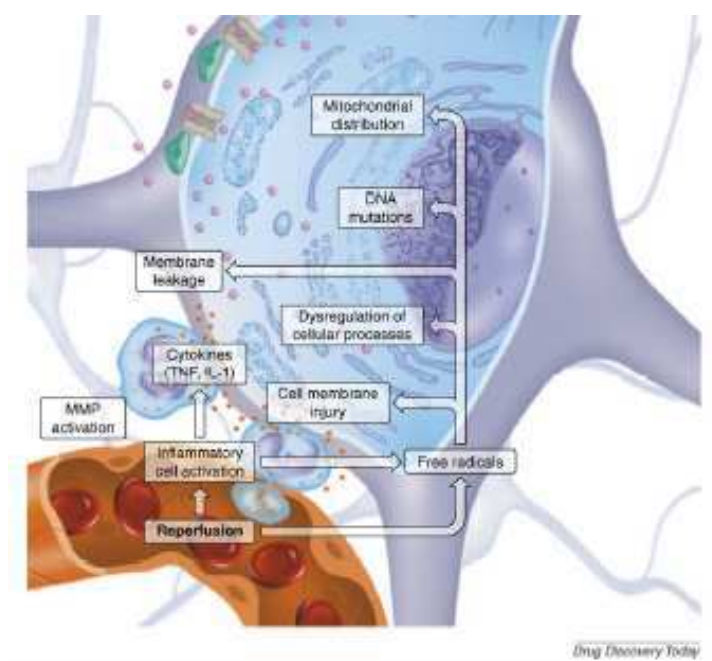


Figure 3 : Voies physiopathologiques principales de l'ischémie cérébrale après la reperfusion (d'après Green et Shuaib, 2006)

Parmi les nombreux agents neuroprotecteurs évalués en clinique, une nouvelle molécule chélatrice de radicaux libres, le NXY-059, était la première à remplir les critères STAIR pour une meilleure translation des études précliniques aux essais cliniques. Le NXY-059 a été étudié dans le programme d'essai clinique SAINT qui se composait deux essais de phase III, SAINT I et SAINT II. L'essai SAINT I avait démontré que le NXY-059 diminuait le handicap indépendamment de la sévérité de l'ischémie, du délai de traitement et de l'utilisation du rt-PA. Une caractéristique importante de l'étude était une diminution apparente de l'incidence des hémorragies chez les patients traités par rt-PA. Dans l'essai SAINT II, un nombre plus important de patients ont été inclus. Malheureusement les résultats de la première n'ont pas été retrouvés (Green, 2008).

I.C.1.c. Inflammation post-ischémique

Mécanismes

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), le facteur induit par l'hypoxie HIF-1 (Rusher et al, 1998), le facteur régulateur des interférons IRF-1 (Iadecola et al, 1999) et le facteur de transcription STAT-3 (Planas et al, 1996). 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 IL-1- β (Lindsberg et al, 1991 ; Stoll et al, 1998 ; Zhang Z et al, 1998). Ces médiateurs vont dans un deuxième temps permettre l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium, en particulier de ICAM-1, VCAM-1, des P-sélectines et E-sélectines (Frinjs et Kappelle, 2002). Ces molécules d'adhésion interagissent avec des récepteurs situés à la surface des polynucléaires neutrophiles afin de favoriser leur adhésion à l'endothélium puis leur migration au sein du parenchyme cérébral (Lindsberg et al, 1996). Les cellules gliales et les astrocytes participent également à ces processus inflammatoires, en particulier au niveau de la zone de pénombre (Stoll et al, 1998).

L'inflammation post-ischémique peut contribuer aux lésions cérébrales par plusieurs mécanismes. L'obstruction secondaire des micro-vaisseaux par l'activation locale de l'agrégation plaquettaire, de la coagulation et des leucocytes peut majorer les lésions ischémiques (Del Zoppo et al, 1991). De même, la production de médiateurs toxiques par les cellules inflammatoires activées et les neurones environnants est un élément déterminant : induction de la NO synthase de type II (NOS 2) qui participe notamment à la formation de radicaux libres (Iadecola et al, 1997) ; expression de la COX 2 impliquée dans la synthèse de radicaux superoxyde et de

prostanoïdes cyto-toxiques (Nogawa et al, 1997). Ainsi, les effets cytotoxiques de l'inflammation sur le tissu cérébro-vasculaire reposent essentiellement sur une amplification du stress oxydant accentuant le déséquilibre entre le potentiel oxydant et les défenses antioxydantes et par là même favorisant l'apoptose. Par ailleurs, les phénomènes inflammatoires interviennent dans l'altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique notamment par l'activation de protéases spécifiques, les métalloprotéinases, favorisant alors l'extension de l'œdème et des lésions tissulaires post-ischémiques (Del Zoppo et Mabuchi, 2003).

L'enlimomab est un anticorps murin anti ICAM-1 qui réduit l'adhésion leucocytaire. Les études précliniques ont montré son efficacité dans des modèles d'ischémie focale avec reperfusion. Dans l'essai clinique EAST multicentrique évaluant l'enlimomab *versus* placebo, 625 patients ont été randomisés. L'essai a montré un effet délétère chez les patients traités par l'enlimomab. Pour élucider les raisons de cet échec clinique, une étude expérimentale a été menée avec ce même anticorps. On observait une production d'auto-anticorps et une activation des polynucléaires neutrophiles circulants et du complément expliquant en partie les effets délétères observés en clinique.

I.C.1.d. Apoptose

Comme nous l'avons déjà vu, la nécrose est le mécanisme prédominant à la phase initiale de l'ischémie, alors que l'apoptose apparaît plus tardivement et siège de manière préférentielle au sein de la zone de pénombre (Leist et Nicotera, 1998 ; Graham et Chen, 2001). L'initiation de l'apoptose résulte de l'activation de gènes d'expression immédiate, sous l'influence de l'hypoxie, de la surcharge en calcium, du NO, qui modulent l'expression de nombreuses protéines impliquées dans le développement de l'apoptose (Graham et Chen, 2001 ; Sims et Anderson, 2002). On distingue ainsi des protéines dont l'expression va favoriser le développement de l'apoptose (protéines pro-apoptotiques : Bax, Bid ...) et des protéines qui au contraire limitent le développement de ce type de mort cellulaire (protéines anti-apoptotiques : Bcl-2, Bcl-x_L...) (Graham et Chen, 2001). La phase effectrice de l'apoptose est en partie modulée au niveau des mitochondries et met en jeu deux voies différentes, l'une faisant intervenir les caspases (protéases) et les DNases caspases dépendantes, et l'autre, directe, faisant appel au facteur inducteur de l'apoptose. L'activation de la voie indirecte des caspases nécessite la libération de cytochrome C par les mitochondries et l'activation du complexe pro-apoptotique, qui associe un facteur activateur de l'apoptose (APAF-1) et la pro-caspase 9. Ce complexe permet l'activation successive des différents effecteurs pour aboutir à la phase finale de l'apoptose par activation de la caspase 3 et d'une DNase caspase-dépendante amenant au clivage

de l'ADN nucléaire en fragments de petite taille correspondant aux nucléosomes (Graham et Chen, 2001 ; Sims et Anderson, 2002). L'autre voie, plus directe, met en jeu le facteur inducteur de l'apoptose (AIF) libéré par la mitochondrie et capable d'induire une fragmentation de l'ADN nucléaire indépendamment de l'intervention de toute autre DNase (Sims et Anderson, 2002).

Toutefois, les évènements conduisant à l'apoptose sont probablement plus complexes et des travaux récents ont apporté des arguments en faveur d'une activation très précoce de l'apoptose au cœur de l'ischémie par des voies indépendantes de la mitochondrie et de la caspase 9 (Benchoua et al, 2001).

I.C.2. Neuroprotection : les raisons d'un échec

Différences physiologiques entre les rongeurs et l'Homme

Des différences neuroanatomiques, physiopathologiques et métaboliques existent entre le rat qui est l'animal le plus souvent utilisé dans les études précliniques pour l'évaluation des agents neuroprotecteurs, et l'Homme. Celles-ci pourraient expliquer en partie les résultats des études expérimentaux plus favorables. La meilleure efficacité de la circulation collatérale chez le rat fournit une défense naturelle contre l'ischémie cérébrale chez ces animaux et elle permet également une meilleure diffusion des agents neuroprotecteurs testés dans la zone de pénombre. Bien que les différences métaboliques entre rongeurs et mammifères soient bien connues, il existe peu d'études comparant la pharmacocinétique des composés chez les animaux et l'Homme afin d'obtenir la dose équivalente ayant un effet certain. Généralement des doses plus élevées sont utilisées chez les petits animaux qu'au cours des essais cliniques.

Différences entre les ischémies cérébrales expérimentales et les AVC spontanés chez les patients inclus dans les essais

L'objectif du modèle expérimental est de reproduire des lésions homogènes et reproductibles avec une variabilité minimale dans le but de produire des résultats probants. Dans ce but, toutes les variables qui pourraient influencer l'extension et la progression des lésions telles que les paramètres physiologiques (température corporelle, pression sanguine, glycémie, gaz du sang, pH), âge, sexe des animaux, territoire exact de l'occlusion et temps exact de l'administration des produits, sont contrôlés. En clinique, il est impossible d'obtenir des groupes de patients similaires. Les essais cliniques regroupent des patients avec des infarctus de localisation différente, d'étiologie et d'extension différents, ainsi que des patients à un âge

avancé et polymédicamentés. Chez ces patients, les agents neuroprotecteurs ne peuvent être administrés avec autant de précision qu'en préclinique. Cette hétérogénéité réduit la puissance des études et rend difficile l'obtention de résultats significatifs.

Raisons attribuables à la pharmacologie, aux mécanismes d'actions et au protocole d'administration du composé

L'efficacité du traitement neuroprotecteur dépend de sa capacité à inhiber les médiateurs de la cascade ischémique et les processus conduisant à la mort neuronale. La démonstration de l'efficacité dans toute étude dépend également du protocole d'administration (moment d'administration, durée de traitement, doses) est appropriée au mécanisme d'action et aux propriétés pharmacologiques de la substance étudiée. Ces éléments ne sont pas suffisamment pris en compte. A titre d'exemple, l'activation des récepteurs par les acides aminés excitateurs et l'élévation calcique intracellulaire surviennent très précocement dans la cascade ischémique et les lésions prennent place très rapidement. Pour cette raison, les antagonistes des récepteurs NMDA et les inhibiteurs calciques doivent être administrés très tôt pour obtenir les effets bénéfiques. Ceci n'est pas envisageable en clinique. A l'inverse, d'autres voies physiopathologiques telles que l'inflammation ou l'apoptose, responsables de lésions différées, nécessitent une fenêtre thérapeutique plus grande et un traitement de plus longue durée.

Une des raisons des échecs des traitements neuroprotecteurs évalués en clinique est le manque de standards acceptables pour l'évaluation des études précliniques. La variabilité des évaluations des études cliniques et le peu de succès des agents neuroprotecteurs évalués en clinique ont conduit à la publication de recommandations pour l'évaluation préclinique : STAIR recommandations (Ford GA, 2008) (tableau 1).

-
- 1 : Evaluer le candidat médicament dans des modèles d'occlusion permanent et transitoire dans deux espèces.

 - 2 : Evaluer de manière convenable un effet-dose dans une fenêtre thérapeutique raisonnable.

 - 3 : Monitoring approprié des constantes physiologiques et l'insu doit être pratiqué.

 - 4 : Mesures histologiques et fonctionnelles doivent être évaluées avec survie prolongée pour s'assurer que les effets du traitement aigu n'est pas perdu

 - 5 : Si possible, les effets du traitement doivent être évalués chez des animaux des deux sexes et âgés.

 - 6 : Les effets du traitement doivent être reproduits dans plusieurs laboratoires, incluant les structures académiques et industrielles.

 - 7 : Les données, positives ou négatives doivent être publiées.

Tableau 1 : critères précliniques STAIR

De nombreux agents pharmacologiques ont eu une utilisation limitée en clinique bien qu'ils aient démontré une efficacité dans divers modèles animaux. Cependant dans ces modèles animaux, il a été montré que l'ischémie cérébrale est une pathologie complexe impliquant de multiples processus biochimiques initiés de quelques minutes, quelques jours voire plus après l'ischémie. Ces processus touchent l'ensemble de l'unité neurovasculaire. Le concept qu'un agent neuroprotecteur seul puisse bloquer la cascade ischémique et par conséquent la mort cellulaire est dorénavant illusoire. Les stratégies neuroprotectrices dans les AVC demandent la combinaison de plusieurs agents neuroprotecteurs afin de bloquer la cascade ischémique à différents niveaux ou bien une seule substance pharmacologique capables d'interagir sur plusieurs voies physiopathologiques de l'ischémie cérébrale. De tels effets pléiotropes peuvent être induits par des substances agissant les récepteurs de facteurs de transcription communément appelés récepteurs nucléaires. Ce type de récepteur est en effet capable de réguler simultanément plusieurs gènes au sein des différents compartiments cellulaires qui constituent l'unité neurovasculaire.

II. Ischémie cérébrale : une pathologie de l'unité neurovasculaire

La plupart des recherches dans le traitement des AVC s'est consacré essentiellement au compartiment neuronal ce qui a entre autre expliqué une des raisons des échecs en thérapeutique humaine. Est donc né le concept d'unité neurovasculaire comprenant l'endothélium, les astrocytes, et les neurones (figure 4). L'ischémie cérébrale n'est pas simplement une pathologie uniquement neuronale ou vasculaire mais touche l'intégralité de cette unité.

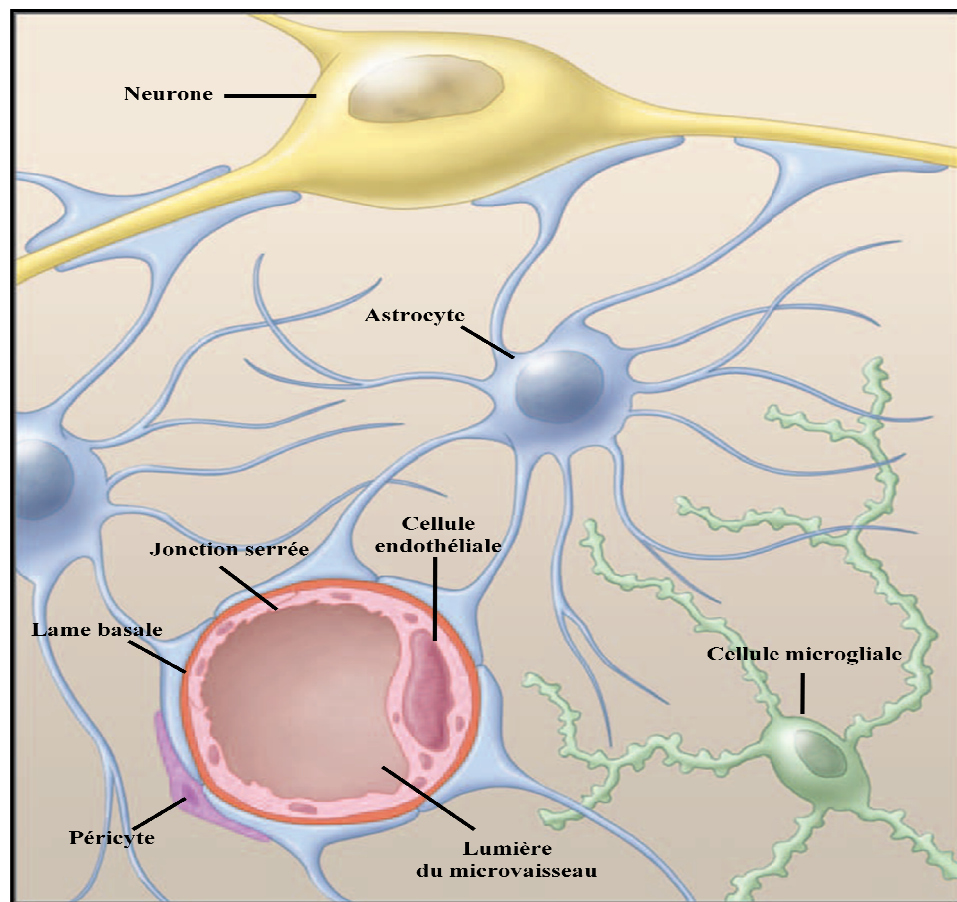


Figure 4 : L'unité neurovasculaire (d'après Del Zoppo, 2006)

II.A. Les acteurs de l'unité neurovasculaire

II.A.1. Les neurones

L'activité neuronale est déterminée par l'activité électrique et synaptique, qui est la résultante de la formation de potentiel d'action, de la libération de neuro transmetteurs et de la réponse électrique et chimique de l'élément post synaptique. La majorité des besoins énergétiques liée à cette activité provient majoritairement de la restauration des gradients ioniques transmembranaires qui sont transitoirement déséquilibrés par les courants sous-tendant

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

II.A.2. La glie

Elles occupent l'espace libre entre les neurones et leurs prolongements et s'interposent entre les cellules nerveuses et les vaisseaux sanguins (Nedergaard and Dirnagl, 2005). Pour cette raison, on leur a longtemps attribué un rôle de soutien. Mais elles participent à beaucoup d'autres fonctions majeures et nécessaires à la physiologie du système nerveux central. Les cellules gliales ne transmettent pas de signal électrique mais sont indispensables au maintien de la composition du milieu dans lequel travaillent les neurones. En fonction de leurs aspects structuraux et fonctionnels, elles sont classées en 4 catégories.

Les astrocytes

Les cellules gliales les plus nombreuses sont les astrocytes qui contribuent au fonctionnement cérébral en étroite synergie avec la fonction neuronale. Les astrocytes représentent l'essentiel de l'environnement dans lequel baignent les neurones

Les autres types de cellules gliales

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

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

II.A.3. L'endothélium

L'endothélium vasculaire n'est pas une simple barrière physique interposée entre la lumière vasculaire et le compartiment sous-endothélial, mais une véritable structure modulatrice des réponses physiologiques et pharmacologiques résultant de l'écoulement du sang (flux-dépendance) et de la présence d'une grande variété de médiateurs. L'endothélium peut aussi exprimer des molécules dites d'adhérence qui conditionnent le maintien et la solidité de la paroi artérielle, ainsi que le passage contrôlé de cellules et de molécules dans l'intima. D'une manière générale, la perméabilité vasculaire et l'endothélium en particulier, jouent un rôle déterminant au cours de la réponse inflammatoire et du passage inter- et trans-cellulaire de nombreux nutriments et molécules circulantes.

II.B. Les interactions

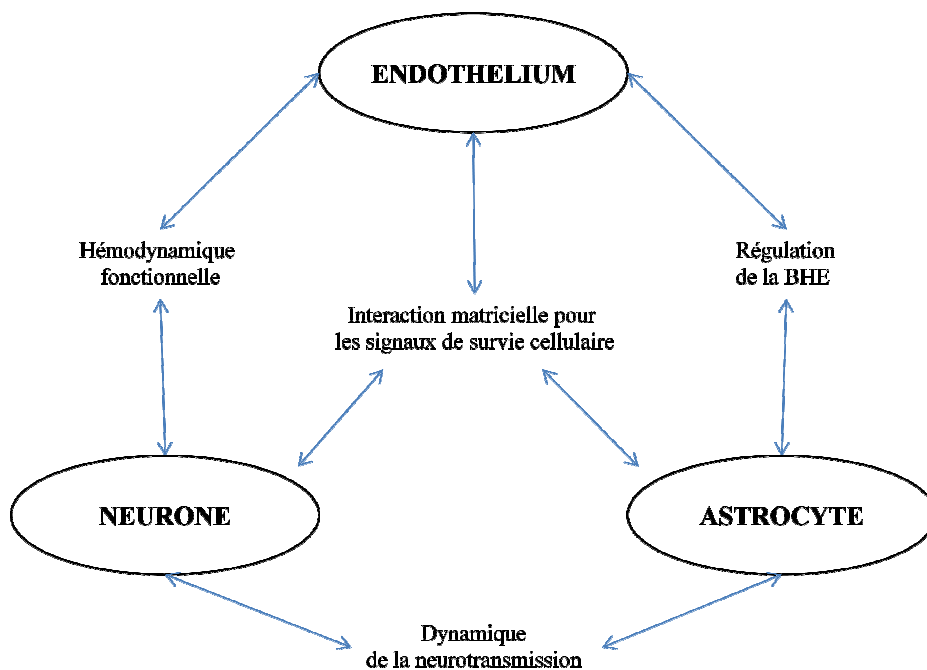


Figure 4 : Schéma des interactions au sein de l'unité neurovasculaire (d'après Lok et al, 2007)

II.B.1. Anatomiques

Selon le territoire de l'occlusion artérielle, le développement de l'ischémie cérébrale est hétérogène. La dysfonction neuronale varie selon le territoire vasculaire et avec le délai séparant du début de l'ischémie. Ceci est cohérent avec la variable irrigation microvasculaire aux neurones expliquant la différence de vulnérabilité neuronale. Dans le cortex et dans le striatum,

les lits vasculaires sont arrangés de manière géométrique. Pour le cortex, l'irrigation artérielle de la substance grise est organisée sous forme de séries descendantes d'un étalage hexagonal des artères pénétrantes de l'artère piale qui irrigue la frontière de la substance blanche. A l'intérieur de la substance blanche, les capillaires sont arrangés en ligne avec les axones. A l'intérieur du striatum où les microvaisseaux et les neurones sont plus ou moins distribués de manière homogène, la relation du neurone aux microvaisseaux avoisinants est hautement ordonnée et cohérente (Del Zoppo, 2008).

II.B.2. Régulation du débit sanguin cérébral

Le cerveau utilise 20 % de l'énergie consommée par le corps alors qu'il ne constitue que 2% de masse totale corporelle. L'augmentation de l'activité neuronale est couplée à l'augmentation du flux sanguin cérébral. Il a été proposé que les neurones activés libéraient des substances qui diffusaient dans l'espace extracellulaire jusqu'aux vaisseaux sanguins produisant une relaxation musculaire lisse. Du point de vue anatomique, il existe clairement des connections hiérarchiques anatomiques entre la vascularisation cérébrale et le parenchyme cérébral. De manière historique, les interactions entre les médiateurs vasoactifs et le flux sanguin cérébral a été disséqué et appelé sous le terme d'autorégulation. L'autorégulation implique la contraction ou la dilatation des vaisseaux de résistance pour maintenir le flux sanguin constant. Non seulement ce mécanisme permet de réguler les fluctuations du flux sanguin mais aussi il prévient des altérations des dommages des microvaisseaux (Lok et al, 2007).

Derrière la régulation de la perfusion, le couplage hémodynamique lie de manière dynamique le flux sanguin à l'activité neuronale. L'activité neuronale affecte le débit sanguin cérébral à travers la combinaison de plusieurs processus. Ceux-ci incluent le tonus vasculaire basal, l'hypérémie fonctionnelle due à la libération de substances vasoactives pendant l'activité synaptique et l'augmentation de la réponse vasodilatatrice.

II.B.3. Barrière hémato-encéphalique

Les principaux composants de la barrière hémato-encéphalique comprennent les cellules endothéliales, la membrane basale, les péricytes et les pieds astrocytaires. Les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique sont pauvres en fenestrations et ont des jonctions serrées importantes qui limitent l'influx de molécules à travers les cellules endothéliales. La membrane basale, une matrice extracellulaire entourant le capillaire, est le second composant de la BHE. Les péricytes sont le troisième composant qui aide à maintenir l'intégrité structurale et fonctionnelle des vaisseaux sanguins. Les péricytes, exprimant des

récepteurs pour de nombreux médiateurs vasoactifs, participeraient à l'autorégulation cérébro-vasculaire. Les pieds astrocytaires autour du capillaire participeraient à la régulation de l'eau via les aquaporines. Les astrocytes et les cellules endothéliales sont engagés dans un complexe circuit qui permet d'autres fonctions, et la signalisation entre les neurones-astrocytes et l'endothélium permet de réguler le contrôle dynamique de la circulation cérébrale.

II.B.4. Neurogénèse, angiogénèse et facteurs neurotrophiques

Des recherches récentes sur l'angiogénèse et la neurogénèse ont montré des similitudes dans ces processus. Ces similitudes incluent des facteurs de croissance communs et de récepteurs, des voies similaires de formations de nouvelles cellules et dans de nombreux cas, un partage du même espace physique... parmi les facteurs communs, le plus connu est le VEGF. Il a été montré que le VEGF est exprimé par les neurones et les astrocytes et jouent un rôle essentiel dans la croissance axonale et la survie neuronale.

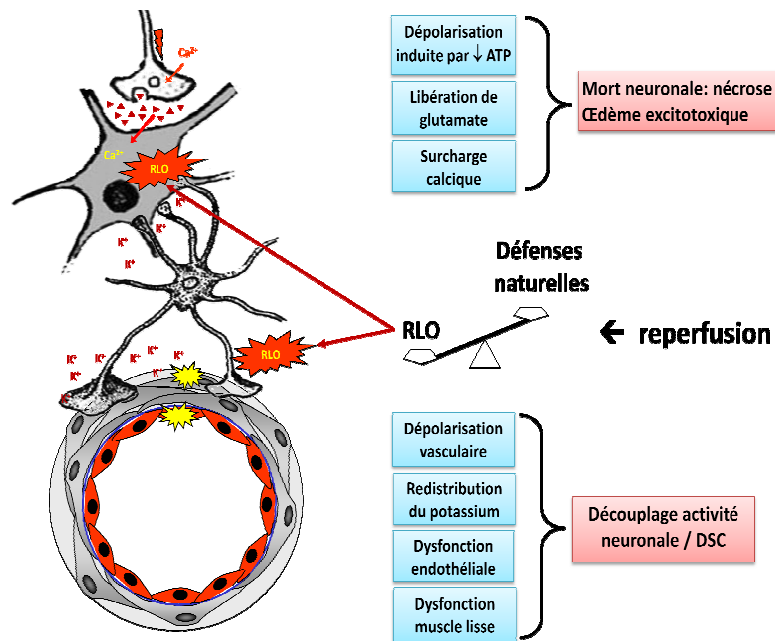
Cette interrelation entre neurogénèse et angiogénèse peut être un puissant déterminant dans la récupération cérébrale après une ischémie. Un des exemples est celui des métalloprotéinases vasculaires. Les MMPs participent aux dommages post-ischémiques mais peuvent jouer un rôle important dans l'angiogénèse, la vasculogénèse et la neurogénèse. Ils ont des effets sur la plasticité et le remodelage vasculaire. La MMP-9 bien qu'elle soit associée aux altérations cellulaires, serait impliquée dans la migration des neuroblastes provenant de l'hippocampe.

Il existe de nombreux exemples d'interactions trophiques entre les différents types cellulaires du système nerveux central. Il est reconnu que les différents types cellulaires face à un signal cérébral donné s'orientent vers tels directions. Ces signaux fournissent un environnement extracellulaire spécifique pour chaque type cellulaire à l'intérieur de l'unité neurovasculaire.

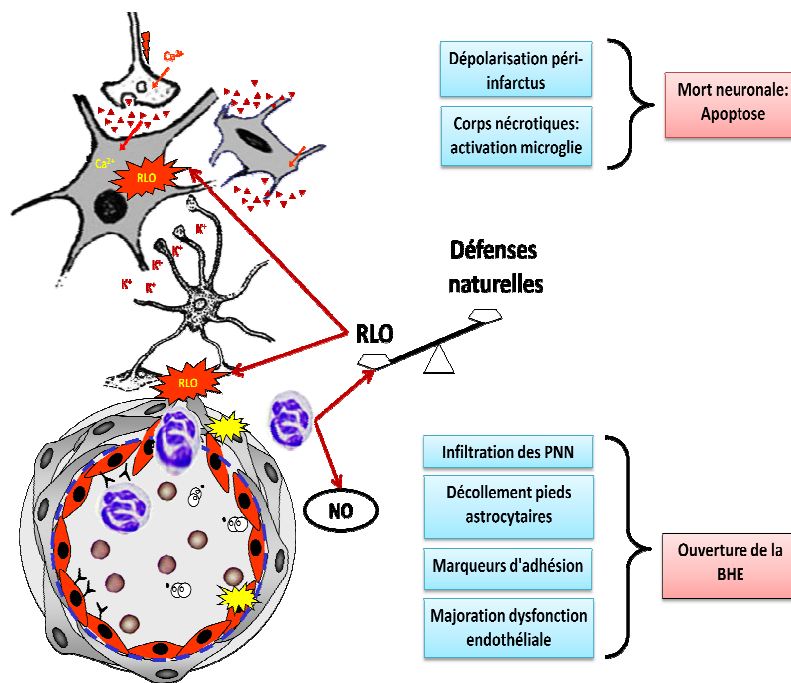
II.C. Les modifications au cours de l'ischémie cérébrale et des transformations hémorragiques

Chaque acteur de l'unité neurovasculaire est affecté par les différentes voies physiopathologiques de l'ischémie cérébrale. En raison des interactions cellulaires qui existent au sein de l'unité neurovasculaire, les altérations post-ischémiques sur un des compartiment

cellulaire aura des répercussions sur les autres compartiments. L'ischémie cérébrale est ainsi responsable de dommages aussi bien cellulaires que fonctionnels (Figure 5).



Ischémie : mécanismes précoces



Reperfusion

Sur le plan fonctionnel, l'autorégulation qui forme un système de protection du tissu cérébral contre les variations de pression artérielle, est altérée après une ischémie-reperfusion. En effet, une étude de la réactivité vasculaire a rapporté que la reperfusion provoquait une perte du tonus myogénique, qui est majorée d'autant plus que le temps de reperfusion est long (Cipolla et al., 2002). Le tonus myogénique correspond à la réponse contractile développée de manière spontanée en fonction de la pression artérielle, et représente une composante majeure du mécanisme de l'autorégulation. Par ailleurs dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat, le muscle lisse développe une altération de la relaxation induite par l'application de KCl. La réponse du muscle lisse aux variations de concentration de potassium extracellulaire, est une des voies principales assurant rapidement le couplage entre le DSC et l'activité neuronale. Les études électrophysiologiques ont permis de montrer que l'ischémie-reperfusion modifie le fonctionnement des canaux potassiques membranaires Kir2.x à l'origine de la relaxation musculaire lisse. De plus, l'altération fonctionnelle de ces canaux est d'autant plus importante que les lésions du tissu cérébral sont sévères, en terme de volume d'infarctus et d'œdème (Bastide et al., 1999).

Sur le plan métabolique, l'effondrement de la production d'ATP et l'acidose consécutive participent aux lésions cellulaires. Lors de l'ischémie suite à la chute drastique de la pression partielle en oxygène, le métabolisme des cellules du tissu cérébro-vasculaire va utiliser les voies anaérobiques de synthèse d'énergie bloquant alors le catabolisme du glucose au niveau du pyruvate qui sera réduit en lactate et en ions H^+ . La présence en grande quantité de CO_2 , de protons acidifiants ainsi que la réduction de l'apport en oxygène vont favoriser le découplage entre le débit sanguin cérébral et l'activité métabolique des cellules en saturant les voies de relaxation de l'endothélium et contribuant à la dysfonction endothéliale. Dans le même temps, cette désorganisation fonctionnelle est concomitante aux voies de dégradation de la matrice extracellulaire post-inflammatoires, abolissant la relation structure/activité des prolongements neuronaux et astrocytaires avec les cellules vasculaires. La perte des récepteurs aux intégrines impliqués dans la cohésion des cellules vasculaires, coïncide avec l'expression des protéines de dégradation de la matrice et les troubles secondaires de la perméabilité de la barrière vasculaire.

II.C.2. Souffrance gliale et mort neuronale

Les astrocytes sont des déterminants critiques dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale puisqu'ils assurent le couplage neurone avec les vaisseaux. Ils fournissent une protection de court terme en libérant des facteurs de croissance et d'autres molécules qui facilitent la neurogénèse et la régénération à une phase plus tardive. Il a été montré qu'après une

ischémie cérébrale focale transitoire, une proportion d'astrocytes à l'intérieur du cœur de l'ischémie restait viable et active métaboliquement aux phases précoces de la reperfusion suggérant que les astrocytes sont plus résistants en comparaison des neurones. Cependant la sévérité de l'ischémie peut compromettre les fonctions astrocytaires et la survie neuronale post-ischémique. De manière précoce, la réponse astrocytaire à l'ischémie incluse un gonflement astrocytaire qui surviennent initialement au niveau des pieds astrocytaires entourant les microvaisseaux. De plus les gap junctions à travers lesquelles les astrocytes fournissent l'énergie aux neurones, contribuent à la propagation de la dépolarisation péri-infarctus.

II.C.3. Polynucléaires neutrophiles

La diapédèse leucocytaire est un phénomène incontournable de la mise en place de l'inflammation. Elle est constituée d'une cascade d'évènements adhésifs et d'activation, permettant la migration du leucocyte. Cette séquence d'évènements peut être divisée en cinq étapes principales : la capture, le roulement, le roulement lent associé à l'activation, l'adhérence ferme et la migration trans-endothéliale (Huang et al, 2006 ; Gavins et al, 2007). 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. Si l'expression des molécules d'adhérence à la surface des cellules permet la régulation du recrutement et de l'adhésion des leucocytes, d'autres protéines telles que la VE-cadhérine exprimée spécifiquement par les cellules de l'endothélium, sont impliquées dans la régulation de la perméabilité des jonctions endothéliales. Une étude a montré que l'adhérence des polynucléaires neutrophiles sur l'endothélium entraîne une disparition de la VE-cadhérine des jonctions, et une augmentation de la perméabilité de l'endothélium (Del Maschio et al, 1996). 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 Soriano, 1996 ; Del Zoppo et Mabuchi, 2003, Justicia et al., 2003).

L'inflammation post-ischémique peut contribuer aux lésions du tissu cérébral par plusieurs mécanismes. Le processus d'occlusion secondaire post-reperfusion en aval des microvaisseaux (*focal "no-reflow"*) par l'activation locale de l'agrégation plaquettaire, des leucocytes et de la coagulation, peut majorer les lésions ischémiques (Del Zoppo et al, 1991). La production de médiateurs toxiques par les cellules inflammatoires activées est aussi un élément déterminant. En effet, dans les modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale chez le rongeur

ainsi que chez les patients ayant présenté un infarctus cérébral, les polynucléaires induisent la NO synthétase de type II (NOS 2) qui, non seulement participe à la formation de radicaux libres en se combinant avec l'anion superoxyde pour former du peroxynitrite hautement toxique, mais aussi favorise une fuite de fer du milieu intracellulaire, qui catalyse la formation de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton (Gross et Wolin, 1995). Outre la NOS 2, les neurones situés au sein de la zone infarctée expriment la forme inductible de la cyclooxygénase (COX-2) qui augmente considérablement le capital d'anion superoxyde par le transfert de l'oxygène moléculaire sur l'acide arachidonique. Les effets cytotoxiques de l'inflammation sur le tissu cérébro-vasculaire reposent essentiellement sur une amplification du stress oxydant accentuant le déséquilibre entre le potentiel oxydant et les défenses antioxydantes et par là même favorisant l'apoptose.

De plus, les polynucléaires ont été aussi impliqués dans l'ischémie cérébrale comme source de métalloprotéinase 9 (MMP-9), protéase qui dégrade la lame basale et détruit la barrière hémato-encéphalique (Gidday et al, 2005). Bien que le mécanisme exact reste à déterminer, il a été montré que la MMP-9 était libérée dans le tissu ischémié de manière concomitante à l'accumulation de polynucléaires neutrophiles dans les microvaisseaux.

II.C.4. Ischémie cérébrale et dysfonctionnement endothélial

Les microvaisseaux cérébraux assurent d'étroites relations entre d'une part, leur endothélium et les éléments de la circulation sanguine avec d'autre part, les neurones et les cellules gliales astrocytaires auxquels ils apportent l'énergétique nécessaire. Très rapidement au décours du processus d'ischémie-reperfusion, les vaisseaux cérébraux répondent de façon dynamique. Les événements immédiats incluent l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique, l'expression de marqueurs d'adhésion des leucocytes, l'effondrement de l'unité fonctionnelle neuro-glio-vasculaire et la dégradation de la matrice extracellulaire qui sont autant de phénomènes influençant la viabilité des cellules avoisinantes et l'intégrité fonctionnelle des relations entre les apports vasculaires et l'activité neuronale et gliale (Del Zoppo and Mabuchi, 2003).

Sur les modèles expérimentaux, les études de la réactivité vasculaire et particulièrement des artères cérébrales, ont permis de mettre en évidence de façon consécutive à une ischémie cérébrale, l'altération de la relaxation endothéliale induite par l'acétylcholine (Cipolla et al, 1998 ; Pétrault et al, 2004). Bien que la dysfonction aiguë apparaisse comme la conséquence de

lésions structurales des cellules endothéliales, la perturbation de la régulation d'un messenger endothélial aussi important que le NO contribue, outre le découplage métabolisme neuronal/régulation du DSC, à des modifications de nombreuses fonctions physiologiques essentielles telles que la perméabilité, la croissance du muscle lisse, la coagulation, les fonctions plaquettaires ou encore la réponse inflammatoire.

II.C.5. Interaction neurovasculaire et complications hémorragiques

Les conséquences vasculaires de l'ischémie cérébrale pourraient être impliquées dans la physiopathologie des complications hémorragiques de la fibrinolyse. Au cours de l'ischémie cérébrale se produit une ouverture de la BHE principalement liée à des altérations de la paroi vasculaire et pouvant favoriser la diapédèse sanguine dans le foyer ischémique (Del Zoppo et Hallenbeck, 2000). Le processus d'ischémie/reperfusion s'accompagne d'altérations fonctionnelles de l'endothélium et du muscle lisse vasculaire dont témoigne, en particulier, une perte de la relaxation endothélium-dépendante (Cipolla et al, 2000), et d'une augmentation de l'expression des protéines d'adhésion, comme ICAM-1, VCAM-1 ou des sélectines, responsables d'une adhésion des polynucléaires qui modifie la perméabilité vasculaire (Del Zoppo et Hallenbeck, 2000). La matrice de la lame basale est également altérée, avec pour conséquence une perte de contact entre les cellules endothéliales et les astrocytes et donc une majoration de la perméabilité vasculaire. Cette atteinte de la lame basale résulte à la fois d'une diminution de l'expression des intégrines qui servent d'ossature à la lame basale et d'une augmentation de l'expression des métalloprotéinases, responsable d'une dégradation enzymatique de la matrice de la lame basale. Les complications hémorragiques de la fibrinolyse seraient ainsi la conséquence en partie de la rupture de la BHE (Del Zoppo et al, 1998), ce qui a été montré expérimentalement en IRM (Knight et al, 1998; Neumann-Haefelin et al, 2002). L'activation par l'ischémie, au niveau des vaisseaux, des plaquettes, des polynucléaires et de la fibrine, jouerait également un rôle (notamment via une occlusion secondaire gênant la reperfusion) puisque l'utilisation d'un antagoniste du récepteur plaquettaire à la glycoprotéine IIb/IIIa réduit de façon significative les hémorragies induites par le rtPA, expérimentalement et en clinique (Lapchak et al, 2002 ; Deshmukh et al, 2005).

Par ailleurs, le rtPA pourrait avoir un rôle propre sur les vaisseaux, participant au risque hémorragique. Plusieurs arguments peuvent être retenus (i) L'expression du tPA dans les neurones, les cellules gliales et les astrocytes semble avoir un effet délétère au cours de l'ischémie par le biais d'une exacerbation des processus d'excito-toxicité (Vivien et Buisson, 2000). Le fait qu'une sur-expression du tPA endogène au cours du processus ischémique

participe à l'extension du processus ischémique et aux lésions vasculaires peut expliquer que le rtPA favorise la survenue des complications hémorragiques; (ii) Le rtPA provoque au moment de la reperfusion des modifications hémodynamiques importantes associées à une augmentation du volume de l'ischémie (Kilic et al, 2001) et définies comme facteurs favorisant l'extension des lésions ischémiques et la survenue de complications hémorragiques sous rtPA (Dijkhuizen et al, 2001 ; Tong et al , 2000 ; Tong et al, 2001); (iii) In vitro, l'application de rtPA sur le vaisseau ischémié aggrave la dysfonction endothéliale induite par le processus ischémique (Cipolla et al, 2000); (iv) In vivo, la reperfusion induite par la lyse du thrombus génère un stress oxydant délétère pour le vaisseau et qui pourrait intervenir dans les complications hémorragiques. Cette hypothèse est confortée par la diminution du risque de complications hémorragiques en cas d'administration d'un piègeur de radicaux libres au moment de la reperfusion par le rtPA (Lapchak et al, 2001; Zhao et al, 2001; Asahi et al, 2000). La diminution du risque serait plus importante lorsque le piègeur de radicaux libres est associé avec un traitement à l'héparine, et associé en plus à une neuroprotection (Zhao et al, 2001); (v) la génèse de plasmine et l'activation par le rtPA d'autres systèmes protéolytiques, comme les métalloprotéinases, est corrélée à une ouverture de la barrière hémato-encéphalique et à un risque majoré de complications hémorragiques (Armao et al, 1997; Fukuda et al, 2004). Le rôle des MMP est en particulier bien étayé dans la survenue des complications hémorragiques par rupture de la BHE, confirmant ainsi le rôle de la paroi vasculaire (Sumii et Lo, 2002, Aoki 2002, Kahles et al, 2005). Expérimentalement, l'inhibition de la métalloprotéinase-9 atténue la survenue des hémorragies induites par le rtPA (Lapchak et al, 2000 ; Lapchak et Araujo , 2001) et en clinique, l'activité plasmatique de la métalloprotéinase 9 est prédictive d'un risque hémorragique au cours de la fibrinolyse (Castellanos et al, 2003; Montaner et al, 2003).

III. Les récepteurs nucléaires PPARs : une cible pléiotrope potentielle

Les PPARs forment une sous-famille des récepteurs nucléaires aux hormones qui incluent les récepteurs à la vitamine D, aux hormones thyroïdes, à l'acide rétinoïque. Chez l'Homme, comme chez le xénope, la souris, le rat ou le hamster, trois isotypes de PPARs ont été identifiés : PPAR- α , PPAR- β/δ et PPAR- γ . Ces trois isotypes diffèrent par leur site et leur niveau d'expression, la nature de leurs ligands et les métabolismes concernés par leur régulation.

III.A. Structure des récepteurs nucléaires PPARs

Du point de vue structural, les PPARs sont constitués, comme la plupart des récepteurs nucléaires, de six domaines fonctionnels : A/B, C, D et E/F. Le domaine A/B est le domaine où sont observées les plus grandes variations entre les récepteurs en terme de longueur et de séquence. Ce domaine comporte un site d'activation de la transcription indépendant de la fixation du ligand (AF-1).

Le domaine C est le plus conservé et correspond au domaine de fixation à l'ADN (DNA-binding domain : DBD). Il est composé de deux modules en doigt de zinc et d'une extension C-terminale. Des sous-domaines ont été identifiés : la « boîte P » est impliquée dans la dimérisation des récepteurs. Le domaine D est une région charnière entre les domaines C et E pouvant faire un angle jusqu'à 180° et pouvant interagir avec des co-répresseurs. Le domaine E est le domaine de liaison du ligand (Ligand-Binding Domain : LBD). Il intervient dans de nombreuses fonctions. Il permet la fixation des ligands mais aussi la dimérisation des récepteurs, la localisation nucléaire et l'activation de la transcription dépendante du ligand (motif AF-2). Le domaine F n'a pas de fonction particulière identifiée.

III.B. Mécanismes d'actions des PPARs

Lorsque les récepteurs PPARs sont activés par un de ses agonistes, ils subissent une modification de sa conformation, rendant accessible son domaine d'hétérodimérisation à son coactivateur, RXR, lui aussi exprimé dans le système nerveux central. Dès lors, le complexe PPAR/RXR va se fixer dans la séquence promoteur de gènes cibles, au niveau de son élément de réponse le PPRE. La fixation du complexe va entraîner l'expression de certains gènes soit de manière positive (par transactivation) soit de manière négative (par transrépression) (figure 5).

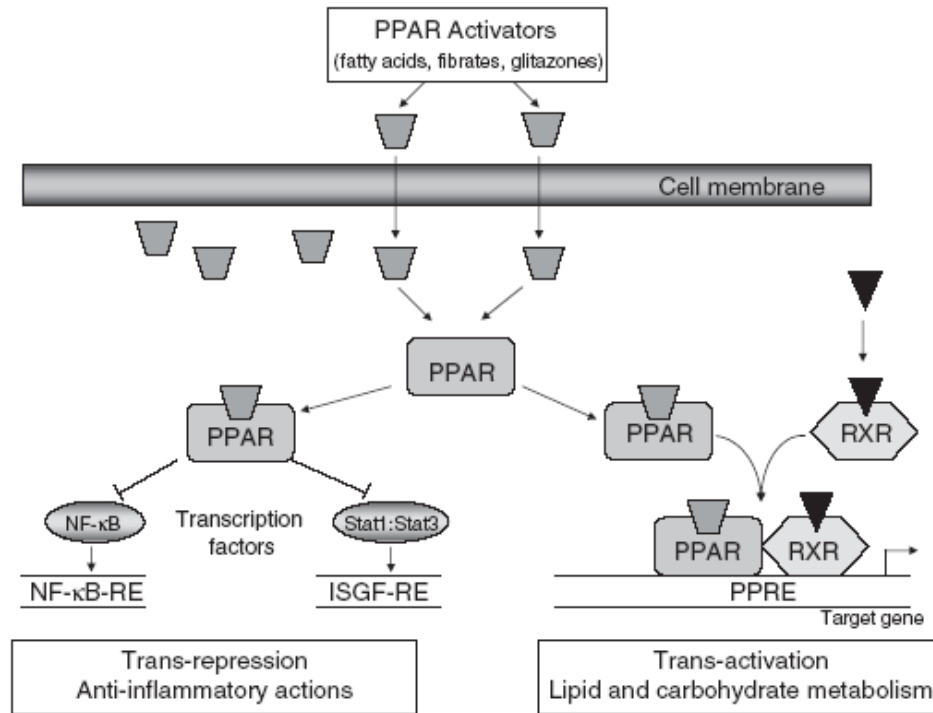


Figure 5 : Mécanismes intracellulaires de régulation des récepteurs PPARs (d'après Touyz et Shiffrin, 2006)

III.C. Distributions régionale et cellulaire des récepteurs PPARs

PPAR- α est exprimé dans les cellules avec un haut ratio de catabolisme des acides gras et d'activités dépendantes des peroxysomes telles que les hépatocytes, les cardiomyocytes, les tubules proximaux du cortex rénal et les cellules de muqueuse intestinale. PPAR- γ a une expression beaucoup plus restrictive. Il est exprimé au niveau du tissu adipeux.

Des études immunohistochimiques ont montré la distribution des récepteurs PPARs dans le système nerveux central (Moreno et al, 2004). Les récepteurs PPAR β/δ ont l'expression la plus ubiquitaire tandis que les récepteurs PPAR- α et PPAR- δ ont une localisation plus restreintes à certaines régions du cerveau (cortex, hippocampe et striatum). Enfin au niveau cellulaire, les récepteurs PPAR- α et PPAR- δ sont exprimés dans les neurones, les astrocytes et les vaisseaux cérébraux (cellules endothéliales et musculaires lisses) de l'unité neurovasculaire.

III.D. Rôle des récepteurs PPARs dans l'inflammation cérébrale

La majorité des fonctions des récepteurs PPARs semblent essentiellement la régulation des métabolismes glucidique et lipidique, et la différenciation adipocytaire dans plusieurs sous-types cellulaires. Mais les PPARs influent également les fonctions immunes et inflammatoires

des macrophages, des lymphocytes T, des lymphocytes B, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Moraes et al, 2005). En fonction du tissu affecté où les récepteurs PPARs sont impliqués, ces récepteurs jouent un rôle dans la modulation de l'intensité, de la durée et des conséquences des phénomènes inflammatoires. Par un mécanisme de transrépression, PPAR- α et PPAR- γ agissent sur l'activation des gènes inflammatoires en interférant négativement sur les voies de signalisation NF- κ B, STAT-1 et AP-1 (Chinetti et al, 1998 ; Staels et al, 1998 ; Delerive et al, 1999). Les récepteurs nucléaires PPARs interagissent ainsi sur les cytokines pro-inflammatoires, les protéines d'adhésions et certaines enzymes.

III.E. Les récepteurs PPAR- α

III.E.1. Les agonistes PPAR- α

Les agonistes naturels de PPAR- α sont issus des lipides ou de leur métabolisme. En effet, les acides gras libres à longue chaîne polyinsaturée, tels que les acides linoléique et linolénique sont des activateurs de PPAR- α . Des dérivés oxydés des lipides par la voie des cyclo- ou lipo-oxygénases ont également été identifiés comme agonistes de PPAR- α ; parmi eux le 8(S)-HETE, le leucotriène B₄ (LTB₄) ou encore le 15dPGJ₂.

Il existe également un certain nombre d'agonistes directs de nature synthétique, notamment les agents pharmacologiques hypolipémiants regroupés au sein de la famille des fibrates. Ces molécules, classiquement utilisées en clinique pour faire baisser le taux de triglycérides plasmatiques, correspondent au fénofibrate, au clofibrate, au bésafibrate et au gemfibrozil.

III.E.2. Effets vasculaires de PPAR- α

Les cellules endothéliales et musculaires lisses expriment les récepteurs nucléaires PPAR- α (Bishop-Bailey, 2000). Dans les cellules endothéliales, les activateurs de PPAR- α interfèrent avec les mécanismes impliqués dans le recrutement et l'adhésion leucocytaires. Les fibrates réduisent l'expression de VCAM-1 induite par les cytokines pro-inflammatoires, limitant ainsi l'adhésion des cellules inflammatoires sur les cellules endothéliales activées. Cet effet serait induit en partie par l'inhibition de NF- κ B (Marx et al, 1999 ; Chinetti et al, 1998). En plus de ces effets anti-inflammatoires, PPAR- α modulerait la production de NO par la NOS endothéliale. En effet, les agonistes de PPAR- α augmentent l'expression de la NOS endothéliale et ainsi la libération de NO, suggérant un effet protecteur au niveau vasculaire (Goya et al, 2004). Au niveau musculaire lisse, l'activation des récepteurs nucléaires PPAR- α interfèrent avec le

processus inflammatoire en inhibant la production d'IL-6 et de prostaglandines induite par IL-1, et en diminuant l'expression de la COX-2 (Chinetti et al, 1998 ; Staels et al, 1998).

III.E.3. PPAR- α et ischémie cérébrale

En raison de nombreux effets pléiotropes indépendants de leurs effets lipidiques, comme des effets anti-inflammatoires ou anti-oxydants, les fibrates pourraient également induire un effet neuroprotecteur préventif. Des données expérimentales suggèrent qu'un traitement préventif avec le bésafibrate diminue la mortalité après ischémie cérébrale chez la gerbille. Un traitement prophylactique de 14 jours par le fénofibrate, un activateur synthétique du récepteur PPAR- α , réduit la susceptibilité à l'ischémie chez la souris rendue hypercholémique par invalidation du gène de l'apolipoprotéine E et diminue le volume d'infarctus cérébral chez la souris normocholestérolémique. Ces effets des fibrates sont complètement absents chez la souris dont le gène PPAR- α a été invalidé signant le rôle de ce facteur nucléaire dans l'effet neuroprotecteur. La neuroprotection préventive induite par les fibrates est liée à la fois à leurs effets antioxydants et à leurs effets anti-inflammatoires. Cette activation cérébrale des enzymes antioxydantes pourrait s'expliquer par la présence PPRE dans le promoteur du gène de la superoxyde dismutase. Un traitement de 14 jours par un fibrate prévient également la surexpression des protéines d'adhésion, comme VCAM-1, qui sont induites par l'ischémie et participent à la cascade inflammatoire. D'autres effets anti-inflammatoires pourraient expliquer les effets neuroprotecteurs des fibrates puisque l'activation du récepteur nucléaire PPAR- α provoque l'inhibition de la NO synthase de type II dans les macrophages, de la cyclo-oxygénase 2 dans les cellules musculaires lisses et des molécules d'adhésion par une régulation transcriptionnelle négative du facteur NF- κ B (tableau 2).

Ligands	Modèles animaux	Mode	Effets	Références
		d'administration et doses		
Fénofibrate	MCAo (souris C57/B6, ApoE, PPAR- α KO)	200 mg/kg, po	↓ volume d'infarctus, pas de changement de iNOS, ↑ Cu/Zn SOD, ↓ VCAM-1, ↓ ICAM-1	Deplanque et al, 2003
WY1463	tCCAO (rat Wistar)	0.1-6 mg/kg	↓ volume d'infarctus, ↓ RLO, ↓ taux de glutathion, ↓ HNE, ↓ HO-1, ↓ NF- κ B, ↓ iNOS, ↓ ICAM-1, ↓ S100 β	Collino et al, 2006

Tableau 2 : Récepteurs PPAR- α et ischémie cérébrale

III.F. Les récepteurs PPAR- γ

III.F.1. Agonistes PPAR- γ

Les récepteurs PPAR- γ peuvent être activé par un certain nombre de ligands, incluant l'acide docohexanoïque, l'acide linoléïque, les antidiabétiques oraux de la classe des thiazolidinediones (pioglitazone, rosiglitazone) et un nombre de lipides incluant LDL oxydé, les eicosanoïdes tels que l'acide 5,8,11,14-eicosatétraynoïque et les prostanoïdes PGA₁, PGA₂, PGD₂ et dérivés de la série des PGJ.

III.F.2. Effets vasculaires de PPAR- γ

De la même manière que PPAR- α , PPAR- γ est exprimé au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses. Dans les cellules endothéliales, les activateurs de PPAR- γ inhibent l'expression de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-1 β et atténue l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 induite par le TNF, protégeant ainsi de l'inflammation au niveau vasculaire (Bruemmer et al, 2005). De manière similaire à PPAR- α , les activateurs de PPAR- γ augmentent la production de NO endothéliale (Calnek et al, 2003). A l'échelon de la cellule musculaire lisse, les agonistes de PPAR- γ inhiberaient leur prolifération et leur migration ainsi que la libération de métalloprotéinases et le stress oxydant (Law and Hsueh, 2001 ; Bruemmer et al, 2005).

III.F.3. PPAR- γ et ischémie cérébrale

Les agonistes des récepteurs PPAR- γ ont démontré des propriétés neuroprotectrices chez les rongeurs. La pertinence des récepteurs PPAR- γ a été prouvée par l'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs qui augmentent le volume d'infarctus.

L'activation de PPAR- γ dans les neurones entre autre diminue l'expression de la COX-2, enzyme impliquée dans la production de radicaux libres oxygénés. De plus PPAR- γ affecte la génération de radicaux libres à plusieurs niveaux. La pioglitazone induit l'expression de l'enzyme anti-oxydante la Cu-Zn superoxyde dismutase, qui scavenge les radicaux libres dans le tissu ischémié. Le traitement de rats par la pioglitazone ou la rosiglitazone avant la réalisation de l'ischémie diminue la production de radicaux libres oxygénés et des nitrites, diminue la peroxydation lipidique et reconstitue les stocks déplétés de glutathion dans l'hippocampe. Les thiazolidinediones (TZD) et non TZD PPAR- γ agonists atténue l'expression de la NOS II. L'activation de PPAR- γ atténue également l'expression d'ICAM-1, de la MMP-9 et divers cytokines inflammatoires dans le tissu cérébral ischémié. Un traitement systémique par la rosiglitazone réduit l'infiltration de la microglie et des macrophages dans les régions autour de la

zone d'ischémie et diminue la production d'IL-1 β . La pioglitazone et la rosiglitazone inhibe NF- κ B et l'activation de p38 kinase (Culman et al, 2007) (Tableau 3).

Ligands	Modèles animaux	Mode		Effets	Références
		d'administration	et doses		
Pioglitazone	pMCAO et tMCAO (rats SD)	20 mg/kg/j, po		↓ volume d'infarctus dans le modèle tMCAO (pas pMCAO), ↑ Cu-Zn SOD	Shimazu et al, 2005
L-796 449	pMCAO (rats Fisher)	1 mg/kg, ip		↓ volume d'infarctus, ↓ iNOS, ↓ MMP-9, ↓ NF-κB	Pereira et al, 2005
Pioglitazone	tMCAO (rats Wistar)	0.16 mg/kg ;j, icv		↓ volume d'infarctus, ↓ œdème, ↓ activation microglie	Zhao et al, 2005
Troglitazone Pioglitazone	tMCAO (rats Wistar)	Tro. 10, 35, 70 mg/kg ; Pio. 1 mg/kg, ip		↓ volume d'infarctus, ↓ microglie/macrophage, ↓ COX2, ↓ iNOS	Sundararajan et al, 2005
Pioglitazone	tMCAO (rats Wistar)	0.16 mg/kg/j, icv		↓ volume d'infarctus, ↓ TNFα, ↓ COX2, ↑ PPARγ	Zhao et al, 2006
Rosiglitazone	tMCAO (rats Wistar)	12 mg/kg/j, ip		↓ volume d'infarctus, ↓ ICAM-1, ↓ MPO, ↓ activation microglie	Luo et al, 2006
Pioglitazone, Rosiglitazone, T0070907	tMCAO (rats Wistar)	Pio. 1 mg/kg, Rosi. 0.1 mg/kg, T0070907 1.5 mg/kg, ip		↑ PPAR-γ ARNm	Victor et al, 2006
Rosiglitazone	tMCAO (rats SD)	3 mg/kg, po		↓ volume d'infarctus, ↓ caspase3, ↓ MPO, ↓ Ox42, ↑ angiogénèse, ↑ eNOS	Chu et al, 2006
15d-PGJ2	tMCAO/CCAO (rats long Evans)	20 µg, icv		↓ volume d'infarctus, ↑ PPARγ	Ou et al, 2006
15d-PGJ2, Rosiglitazone	tMCAO/CCAO (rats long Evans)	15d-PGJ2 20 µg, rosi. 50 mg		↓ volume d'infarctus, ↓ dégradation IKBa, ↓ caspase 3, ↑ PPARγ, ↓ stress oxydant, ↓ RLO	Lin et al, 2005
Pioglitazone, Rosiglitazone	tCCAO (rats Wistar, souris C57/B6)	1-6 mg/kg, iv		↓ volume d'infarctus, ↓ stress oxydant, ↓ COX2, ↑ MAPK, ↑ NF-κB	Collino et al, 2006b
Rosiglitazone, Pioglitazone	tMCAO (rats SD, souris C57/B6)	0.5-6 mg/kg, ip		↓ volume d'infarctus, ↓ ICAM-1, ↓ microglie/macrophage, ↑ catalase, ↑ Cu-Zn SOD, ↑ SOCS3, ↓ STAT phosphorylation	Tureyen et al, 2007
Pioglitazone	Ischémie globale (souris C57/B6)	40 mg/kg/j, po		↓ dommage neuronal, ↓activité MMP-9	Lee KJ et al, 2008

Pioglitazone	tMCAO (rats Wistar)	3 nmol/h, icv	↓ volume d'infarctus, ↓ expression IL-6	Patzer et al, 2008
Pioglitazone	tMCAO (souris 129/SV)	20 mg/kg, ip	↓ volume d'infarctus, ↓ activation microglia, pas d'effet bénéfique à long terme sur fonctions motrices	Ji et al, <i>in press</i>

Tableau 3 : Récepteurs PPAR- γ et ischémie cérébrale

III.G. Les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase : les statines

III.G.1. Les statines : un activateur indirect des récepteurs PPARs

L'HMG-CoA réductase est l'enzyme limitante de la voie mévalonate pour la biosynthèse du cholestérol. Cette enzyme est présente dans le foie et dans les tissus non hépatiques catalysant la conversion précoce de l'HMG-CoA en acide mévalonique. Par leur analogie structurale avec l'HMG-CoA, les statines inhibent de manière compétitive l'HMG-CoA réductase. Ainsi les statines réduisent le cholestérol dans le foie, qui conduit à un rétrocontrôle négatif des récepteurs aux LDL permettant ainsi une diminution du taux de cholestérol sérique.

De récentes études ont montré que les statines pourraient agir par des mécanismes impliquant la voie des récepteurs nucléaires PPARs (Jasinska et al, 2007 ; Paumelle and Staels, 2008). Les statines exerceraient deux effets différents sur les récepteurs nucléaires PPARs : (i) *in vitro* ils augmenteraient l'expression de PPAR-alpha ; (ii) ils augmenteraient l'activité transcriptionnelle de PPAR-alpha.

III.G.2. Effets vasculaires des statines

En plus de leur propriété hypocholestérolémiant, les statines exercent des effets pléiotropiques. Ces effets pléiotropiques comprennent une amélioration de la fonction endothéliale, une augmentation de la biodisponibilité du NO, des propriétés anti-oxydantes, une inhibition des réponses inflammatoires, des actions immunomodulatrices et une stabilisation de la plaque d'athérome.

La diminution de la cholestérolémie est vraisemblablement le mécanisme principal d'action des statines soulignant l'effet bénéfique des statines. Mais cette propriété pourrait expliquer en partie leur effet sur la vasodilatation endothélium-dépendante. La diminution de la

cholestérolémie a pour conséquence en particulier la diminution des espèces réactives de l'oxygène et des LDL oxydées qui jouent un rôle délétère sur la dilatation artérielle (Koh, 2000). D'un autre côté, les statines exercent également un effet direct sur l'endothélium en augmentant la production de NO endothéliale via la stimulation de la NOS endothéliale (eNOS) (Laufs et al 2000 ; Sironi et al, 2003). Il a été montré aussi que les statines inhiberaient l'isoprénnylation de la protéine Rho et donc son activation, résultant ainsi en une augmentation de la stabilité de l'ARNm de la NOS endothéliale (Laufs and Liao, 1998) et en une expression de la NOS endothéliale. L'inactivation des protéines Rho est donc un effet immédiat des statines, indépendant de la baisse de la cholestérolémie. De plus de récents travaux ont montré des effets inhibiteurs des statines sur les molécules d'adhésions telles que ICAM-1 (Chung et al, 2002 ; Okouchi et al, 2003), VCAM-1 et E-selectine, qui sont impliquées dans l'adhésion, le rolling et l'extravasation des cellules inflammatoires. Néanmoins les effets des statines sur l'inflammation vasculaire médiée par les protéines d'adhésion restent controversés. Dans une étude, il a été observé une induction par la lovastatine des E-sélectines, ICAM-1 et VCAM-1 sur des cellules endothéliales vasculaires activées par le TNF- α (Schmidt et al, 2002).

III.G.3. Statines et ischémie cérébrale

Des études expérimentales ont permis de montrer qu'un traitement prophylactique de 14 jours avec différents inhibiteurs de l'HMG CoA réductase (simvastatine, atorvastatine) provoquaient de manière dose-dépendante, et en l'absence de désordre lipidique, une réduction du volume d'infarctus et une amélioration du déficit neurologique. Cet effet neuroprotecteur pourrait être en partie lié aux effets vasculaires de ces statines puisqu'elles augmentent le débit sanguin cérébral et activent l'expression de la NO synthase endothéliale. D'autres mécanismes, liés aux effets pléiotropes des statines, ont été évoqués sans qu'aucune démonstration n'ait été apportée. Les effets anti-inflammatoires des statines pourraient être impliqués : inhibition des interactions leucocytes-endothélium ou de la libération des cytokines : blocage de l'induction des protéines de l'inflammation comme la NOS 2. Des effets anti-oxydants démontrés avec les statines dans certains modèles cellulaires pourraient également expliquer ces effets neuroprotecteurs (Tableau 4).

Ligands	Modèles animaux	Mode		Effets	Références
		d'administration	et doses		
Simvastatine, Lovastatine	tMCAO (souris 129/SV, souris C57/BL6, Souris eNOS KO)	0.2-20 mg/kg, sc		↑ flux sanguin cérébral, ↓ volume d'infarctus	Endres et al, 1998
Atorvastatine	tMCAO (souris 129/SV, souris eNOS KO)	0.5, 1, 10 mg/kg, sc		↓ volume d'infarctus, ↑ eNOS ARNm (aorte, thrombocytes), ↓ PF4 et β-TG plasmatique	Laufs et al, 2000
Rosuvastatine	tMCAO (souris 129/SV)	0.2, 2, 20 mg/kg, sc		↓ volume d'infarctus, ↑ eNOS ARNm et eNOS (cellule endothéliale)	Laufs et al, 2002
Cerivastatine	SHR SP	2 mg/kg, po		↓ incidence et taille d'infarctus, ↓ anion superoxyde, ↓ infiltration leucocytes	Kawashima et al, 2003
Simvastatine	pMCAO (rats Sprague Dawley)	20 mg/kg, sc		↓ volume d'infarctus, ↑ eNOS	Sironi et al, 2003
Pitavastatine	CCAO (gerbille)	10 mg/kg/j		↓ perte neuronale CA1, ↑ eNOS	Kurosaki et al, 2004
Pitavastatine	CCAO (gerbille)	3, 10, 30 mg/kg/j		↓ perte neuronale CA1, ↓ GFAP et S100β (astrocytes)	Muramatsu et al, 2004
Rosuvastatine	tMCAO (souris C57/BL6, souris eNOS KO)	20 mg/kg, ip		↓ effets délétères tPA (↓ eNOS, ↑ ERK-2, ↓ p38)	Kilic et al, 2005
Simvastatine, atorvastatine	tMCAO (souris 129/SV, souris C57/BL6, souris eNOS KO et tPA KO)	20 mg/kg, sc		↓ volume d'infarctus, ↑ eNOS et tPA ARNm, pas d'effets sur souris tPA KO dans modèle embolique	Asahi et al, 2005
Simvastatine	tMCAO (rats Sprague Dawley)	100 mg/kg/j, ip		↓ volume d'infarctus, amélioration reperfusion microvasculaire	Shabanzadeh et al, 2005
Rosuvastatine	tMCAO (souris C57/B6)	0.5, 5, 20 mg/kg, ip		↓ volume d'infarctus, ↓ Erk-1/-2, ↓ caspase 3 activée	Kilic et al, 2005b
Atorvastatine	pMCAO (rats Long-Evans)	10 mg/kg, po		↓ volume d'infarctus, pas d'influence sur paramètres hémodynamiques cérébraux	Yrjänheikki et al, 2005
Atorvastatine	MCAO (rats Wistar, souris eNOS KO)	20 mg/kg/j, po		↓ volume d'infarctus, ↓ vWF, ↓ PAR-1, ↓ ICAM-1, ↓ MMP-9	Zhang et al 2005

Simvastatine	pMCAO (rats Sprague-Dawley)	20 mg/kg/j, sc	↓ volume d'infarctus, ↓ NF-κB, ↓ ERK1/2	Sironi et al 2005
Atorvastatine	tMCAO (rats Wistar)	20 mg/kg/j, sc	↓ volume d'infarctus, ↑ flux sanguin cérébral	Ding et al, 2006
Pravastatine	tMCAO (rats Wistar)	20 mg/kg/j, po	↓ volume d'infarctus, ↓ perte de collagène type IV, ↓ extravasation hémoglobine	Trinki et al, 2006
Pravastatine	tMCAO (rats Wistar)	50 mg/kg/j	↓ volume d'infarctus, récupération fonctionnelle	Sugiura et al, 2007
Pravastatine	tMCAO (rats Wistar)	0.1-2 mg/kg/j, ip	↓ volume d'infarctus, ↓ augmentation glutamate, ↓ libération IL-6, amélioration flux sanguin cérébral	Berger et al, 2008
Rosuvastatine	tMCAO (souris 129/SV)	0.02-20 mg/kg, ip ou iv	↓ volume d'infarctus (iv 0.2 mg/kg), ↓ volume d'infarctus (ip 20 mg/kg)	Prinz V et al, 2008

Tableau 4 : Ischémie cérébrale et statines

PRESENTATION DU TRAVAIL

Le développement de nouvelles approches pharmacologiques pour le traitement de l'ischémie cérébrale nécessite de mieux appréhender les interactions au sein de l'unité neurovasculaire qui jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et/ou des complications hémorragiques de la thrombolyse. Dans ce cadre, nous nous sommes particulièrement intéressés au polynucléaire neutrophile, un des médiateurs possibles des interactions entre vaisseau et parenchyme susceptibles d'expliquer la réaction inflammatoire post-ischémique. La complexité de l'unité neurovasculaire et des relations cellulaires et moléculaires en son sein expliquent que plutôt que de cibler un mécanisme physiopathologique donné, la neuroprotection pharmacologique nécessite de devenir pléiotrope par une modulation simultanée de plusieurs types cellulaires et/ou de plusieurs mécanismes. Parmi les cibles pléiotropes possibles, nous nous sommes focalisés sur la modulation par deux classes d'agents hypolipémians du récepteur PPAR- α en raison de ses propriétés anti-inflammatoires potentielles tant à l'échelon parenchymateux que vasculaire, en reliant plus particulièrement ses propriétés protectrices à son effet sur le polynucléaire neutrophile.

Dans une première partie, nous avons étudié l'influence d'une modulation pharmacologique du polynucléaire neutrophile dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et des complications hémorragiques de la thrombolyse. La déplétion ou l'inactivation des polynucléaires neutrophiles préviennent simultanément les conséquences parenchymateuses et vasculaires de l'ischémie, suggérant que le polynucléaire neutrophile joue un rôle de médiateur physiopathologique au sein de l'unité neurovasculaire via l'interaction leucocyte-endothélium et l'infiltration parenchymateuse (article 1). Ce rôle est également démontré dans une modèle de complications hémorragiques post-ischémiques : réduction des lésions hémorragiques par la déplétion ou l'inactivation (article 2) ; aggravation par l'activation de la lignée granulocytaire (article 3). Au plan du mécanisme, ces travaux suggèrent l'importance du compartiment vasculaire dans la formation des complications hémorragiques.

Dans une deuxième partie, nous avons mis en évidence l'effet neuroprotecteur préventif du fénofibrate, un activateur direct du récepteur PPAR- α , et de l'atorvastatine, un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase ayant un effet indirect sur les récepteurs PPAR- α . Ces effets protecteurs sont associés à un double effet anti-inflammatoire à la fois parenchymateux et vasculaire. L'observation que les effets vasculaires du fénofibrate sont perdus en cas d'arrêt avant la réalisation de l'ischémie avec une perte partielle de l'effet protecteur a fait suggérer l'hypothèse d'un effet du fénofibrate à la phase aiguë de l'ischémie (article 4). De fait, l'administration aiguë

de fénofibrate provoque une réduction significative de la taille de l'infarctus chez la souris et le rat, en lien avec une prévention de la dysfonction endothéliale post-ischémique (article 5). Les interactions leucocyte-endothélium et l'infiltration du polynucléaire neutrophile constituent un des mécanismes de cet effet protecteur cérébral et contribuent également à la prévention des complications hémorragiques de la thrombolyse par l'administration aiguë de fénofibrate (article 5).

Ces résultats amèneront à discuter (i) du rôle des interactions leucocyte-endothélium dans l'ischémie cérébrale (ii) de la modulation de ces interactions par les récepteurs nucléaires PPAR- α (iii) des perspectives cliniques et thérapeutiques.

MATERIEL ET METHODES

I. Animaux

Compte tenu du modèle de complications hémorragiques induites par le rtPA, mis au point à partir d'un modèle d'ischémie/reperfusion cérébrale chez le rongeur, l'ensemble des travaux a été réalisé chez des rats mâles Wistar, Wistar Kyoto (WKY) ou des rats spontanément hypertendus (SHR), âgés de 10 semaines et de poids compris entre 280 et 320 grammes. Ces rats étaient hébergés par groupe de 10 animaux dans un environnement contrôlé à 20 C avec alternance jour-nuit de 12 heures et accès libre à l'eau ainsi qu'à la nourriture (régime standard).

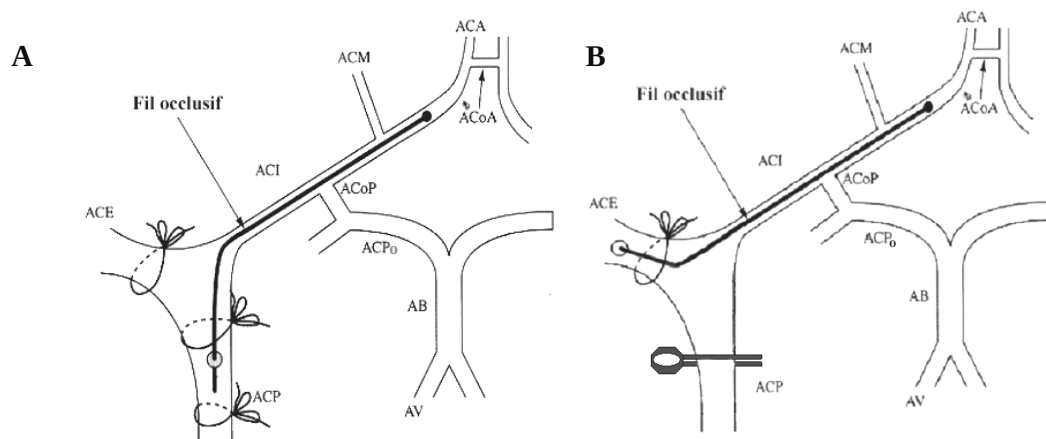
Des souris C57/B6 black étaient utilisées pour le protocole de microscopie intravivale.

II. Méthodes

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

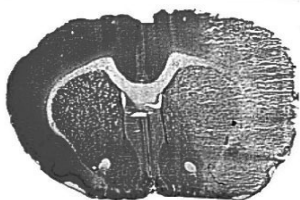
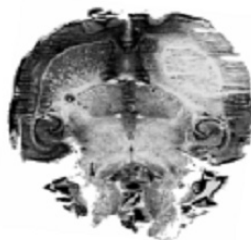
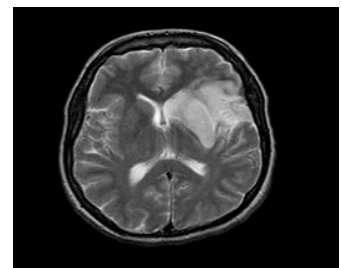
L'ischémie cérébrale focale avec reperfusion est obtenue par la méthode d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne décrite par Zea-Longa et al (1989), modifiée dans le cadre du modèle de complications hémorragiques. L'intérêt de ce modèle d'occlusion réside dans le fait que l'artère cérébrale moyenne ne subit pas de lésions directes (à la différence d'un modèle thromboembolique), ce qui permet son étude ultérieure par les techniques d'exploration vasculaire. Après anesthésie à l'hydrate de chloral (300 mg/kg i.p.), une incision est réalisée au niveau de la région cervicale afin d'exposer la bifurcation carotidienne droite. Sous microscope chirurgical (Wild M650, Wild Heerbrugg), la bifurcation carotidienne et l'artère carotide externe sont dégagées, cette dernière étant ligaturée à son origine, de même que l'artère ptérygopalatine (première branche de division de l'artère carotide interne). La carotide primitive est également ligaturée le plus en amont possible de la bifurcation. Dans ces conditions, un micro-clip chirurgical est posé sur la partie proximale de la carotide interne. Une artériotomie est alors réalisée sur la carotide primitive afin de permettre le passage d'un fil de nylon chirurgical 4/0 (Dafilon[®], Braun) dont l'extrémité est préalablement arrondie à la flamme. Ce filament, sécurisé par une suture est prudemment avancé dans l'artère carotide interne afin que son extrémité vienne obstruer l'ostium de l'artère cérébrale moyenne, soit une longueur calibrée de 22 mm au-delà de la bifurcation carotidienne. L'extrémité restante du fil de nylon étant disposée soigneusement à l'extérieur de la plaie pour permettre le retrait, l'incision cervicale est refermée puis l'animal replacé en cage. Après 60 minutes, la reperfusion du tissu cérébral ischémié est assuré par l'intermédiaire du polygone de Willis après retrait du fil de nylon (figure 6). Ce modèle d'occlusion a été adapté pour le modèle de complications hémorragiques afin d'accroître

le débit de perfusion au moment de la reperfusion. En effet, la ligature définitive de l'artère carotide primitive ne permet pas, au moment de la reperfusion, une diffusion efficace au sein de l'artère cérébrale moyenne du fibrinolytique dont la durée d'action est réduite (quelques minutes), comme quelques essais préliminaires nous l'ont confirmé. Nous avons donc choisi d'utiliser une technique modifiée utilisant la carotide externe comme artère d'introduction du fil d'ischémie. La modification réside dans le fait que l'artériotomie n'est plus réalisée sur la carotide primitive mais sur la carotide externe, ce qui permet une ligature provisoire de la carotide primitive permettant une reperfusion plus efficace. Il est à noter qu'en raison sans doute de cette reperfusion plus efficace, le volume d'infarctus mesuré après ischémie par la carotide externe est inférieur à celui mesuré après ischémie par la carotide primitive (environ 140-150 mm³ vs 180-190 mm³).



Occlusion de l'artère cérébrale moyenne droite (ACM) **A** : par la carotide interne ; **B** : par la carotide externe

ACE : Artère Carotide Externe ; **ACP** : Artère Carotide Primitive ; **ACI** : Artère Carotide Interne ; **ACA** : Artère Cérébrale Antérieure ; **ACM** : Artère Cérébrale Moyenne ; **ACP0** : Artère Cérébrale Postérieure ; **ACoA** : Artère Communicante Antérieure ; **ACoP** : Artère Communicante Postérieure ; **AV** : Artère Vertébrale ; **AB** : Artère Basilaire.

C**D****E**

Conséquences cérébrales de l'occlusion de l'ACM : reproductibilité du rat à l'homme

C : coupe chez le rat ; **D** : coupe chez l'homme ; **E** : IRM chez l'homme

Figure 6: Modèle d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne

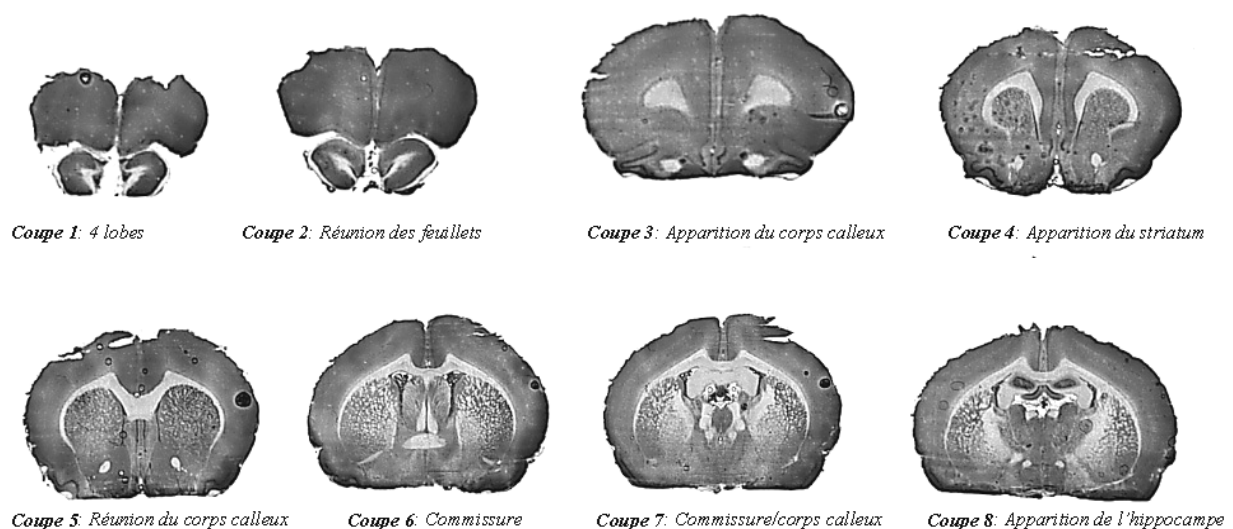
II.B. Paramètres physiologiques

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

II.C. Histomorphométrie

II.C.1. Prélèvement et coupes histologiques

Vingt-quatre heures après la reperfusion, les animaux sont sacrifiés par surdosage en pentobarbital (200 mg/kg i.p.) et décapités afin de permettre le prélèvement du cerveau, rapidement congelé dans l'isopentane à -80 °C. A partir des données de l'atlas de stéréotaxie de Paxinos et Watson (1986), des coupes frontales d'une épaisseur de 50 μ m sont réalisées avec un microtome (CM 3050S, Leica) selon 12 niveaux distants de 1 mm chez le rat (figure 7).



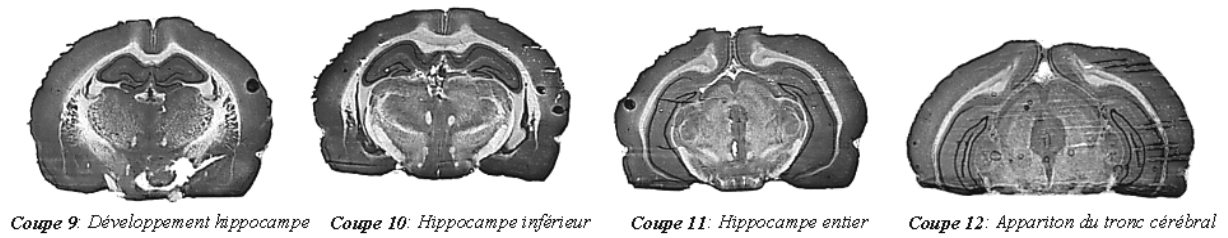


Figure 7 : Différentes coupes nécessaires au calcul du volume de l'infarctus cérébral

II.C.2. Coloration

Après une fixation au FAM (formaldéhyde : 20 ml; acide acétique : 20 ml; méthanol : 160 ml) les coupes sont rincées à l'eau courante pendant 10 min puis dans l'eau distillée pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite plongées dans du crésyl violet filtré (eau distillée : 80 ml; éthanol 100° : 20 ml; acétate de crésyl violet : 500 mg) pendant 3 min puis déshydratées dans des bains successifs d'alcool (éthanol 70°, 95°, 100°) pendant 30 secondes chacun. Les coupes sont finalement éclaircies dans du Clearene[®] pendant une durée de 5 min avant montage des lamelles couvre-objets avec de l'acrytol.

II.C.3. Quantification du volume de l'infarctus

A l'examen des lames, les zones non colorées sont considérées comme infarctées (figure 8), l'éclaircissement de la teinte de la coloration reflétant la diminution de la densité cellulaire. La mesure de l'aire des surfaces d'intérêts (hémisphère droit, hémisphère gauche, infarctus sous-cortical, infarctus total) est réalisée à l'aide du logiciel ColorImage 1.32 (W. Rasband, NIH), après numérisation des coupes histologiques. Les volumes sont alors calculés par intégration des surfaces mesurées.

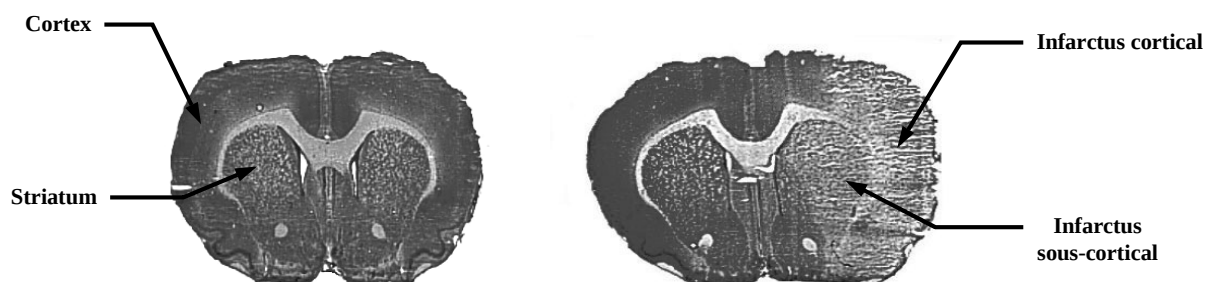


Figure 8 : Zones de quantification du volume de l'infarctus

II.C.4. Œdème cérébral

De manière à éliminer l'effet de l'œdème cérébral qui majore faussement le volume de l'infarctus (Lin et al, 1993), une formule de correction a été utilisée. Celle-ci permet de calculer le volume de l'infarctus total corrigé (VITc) à partir des volumes mesurés de l'infarctus total (cortical et sous-cortical : VIT), de l'hémisphère sain (VHS) et de l'hémisphère lésé (VHL). La formule utilisée, adaptée des travaux de Lin, s'écrit sous la forme : $VITc = VIT - (VHL - VHS)$ lorsqu'il s'agit d'une correction par la différence. On considère alors que la différence entre le volume de l'hémisphère lésé (VHL) et celui de l'hémisphère sain (VHS) représente la totalité de l'œdème, celui-ci étant presque exclusivement contenu dans la zone ischémisée (Lin et al, 1993). L'œdème cérébral peut aussi être pris en compte par le calcul des volumes corrigés de l'œdème par le rapport avec la formule suivante : $VITc = VIT \times VHL/VHS$. Cette correction par le rapport entre les deux hémisphères a l'avantage d'être applicable aussi bien sur l'infarctus total que sur l'infarctus cortical et sous-cortical.

II.C.5. Quantification des complications hémorragiques

Les transformations hémorragiques ont été quantifiées de façon visuelle, au moment de la coupe des cerveaux. Chaque transformation hémorragique a été identifiée, enregistrée en « présence » ou « absence », et le nombre de pétéchies a été compté sur 6 niveaux de coupes (niveaux de 2.7 mm à – 2.30 mm par rapport au bregma, atlas de Paxinos et Watson). Deux types de complications hémorragiques ont été définis (Caplan, 1999) : d'une part, l'infarctus hémorragique, caractérisé par une diapédèse de globules rouges au niveau du tissu infarci et qui se traduit le plus souvent par des pétéchies. D'autre part, l'hémorragie parenchymateuse, caractérisée par un hématome développé dans le tissu cérébral ; cette manifestation est plus sévère que l'infarctus hémorragique.

II.D. Méthode d'analyse de la fonction vasculaire cérébrale

II.D.1. Principe

L'étude est réalisée avec un artériographe d'Halpern (modèle CH/2/A, Living System Instrumentation). Deux canules de verre d'un diamètre d'environ 125 μ m permettent la mise en place d'une artère de petit calibre de 100 à 300 μ m de diamètre. La canule proximale est connectée à un capteur de pression (P1) reliée à un contrôleur de flux qui se compose d'une micro-pompe péristaltique (P270, Instech) et une interface de contrôle de pression (Pressure

Servo Control, Living System Instrumentation). La canule distale est fermée afin d'effectuer l'analyse en l'absence de flux. Le système maintient la pression intraluminaire constante. Après le montage de l'artère, l'artériographe est disposé sur un microscope à focale inversée (Leica DMIL) équipé d'une caméra vidéo (Sony MPT-M308CE) reliée à une interface d'analyse de contraste (Video Dimension Analyser, modèle V94). Après étalonnage, les variations du diamètre intraluminal de l'artère étudiée en fonction de l'application dans la cuve de différents agents pharmacologiques sont enregistrés sur cassette numérique (Biologic DTR 1205). Au circuit de perfusion intraluminaire vient s'ajouter un second circuit permettant la perfusion de solution saline maintenue à 37 °C dans la cuve de l'artériographe (figure 9).

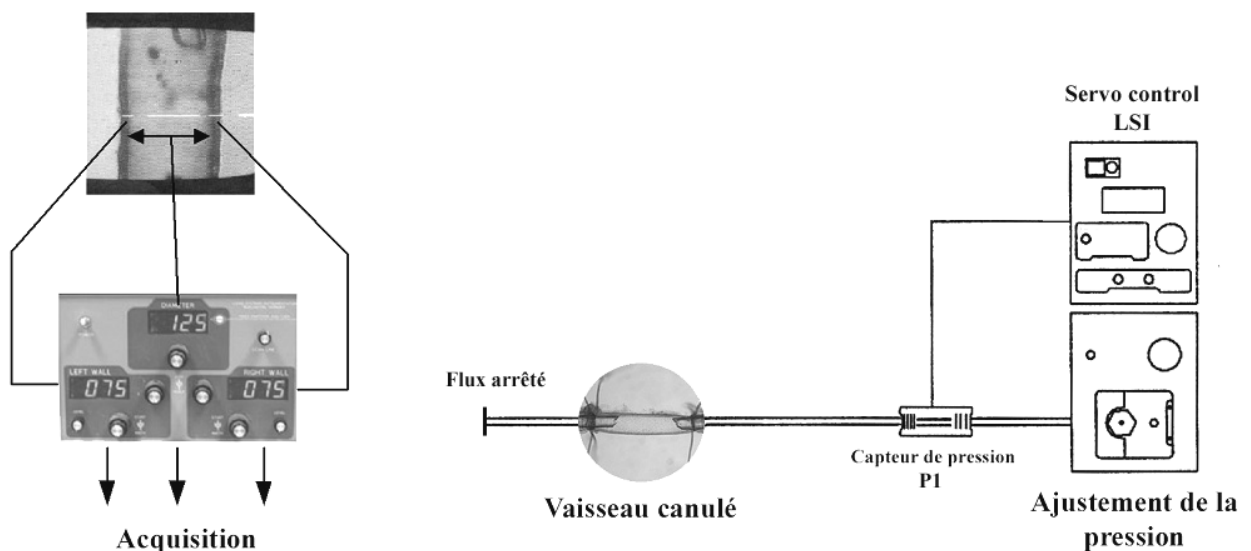


Figure9 : Principe de l'artériographe d'Halpern

II.D.2. Mise en œuvre

Afin de prélever l'artère cérébrale moyenne, le cerveau est déposé immédiatement après le sacrifice dans une solution physiologique saline refroidie et oxygénée (O_2 / CO_2 : 5% / 95%) mise sur un pain de glace sous une loupe binoculaire. L'artère cérébrale est alors soigneusement dégagée du tissu conjonctif environnant et prélevée. Le segment artériel étudié correspond à la portion M1 de la classification de Fischer. Le montage de l'artère cérébrale moyenne est ensuite réalisé dans la cuve de perfusion de l'artériographe contenant la solution physiologique saline

soumise aux mêmes conditions de température et d'oxygénation qu'au moment du prélèvement. Le montage s'effectue sous une loupe binoculaire à grossissement $\times 40$ et l'oxygénation doit être permanente tout au long de la procédure (figure 10). La rapidité de l'opération est déterminante pour la viabilité de l'artère. Le choix du terrain d'étude vasculaire doit être vierge de collatérales afin de maintenir l'étanchéité du montage. Le système est finalement disposé sur la platine du microscope à focale inversée et la cuve de l'artériographe perfusée par la solution saline chauffée progressivement puis maintenue à 37°C . L'artère est stabilisée à une pression intraluminale de 25 mmHg pendant une heure.

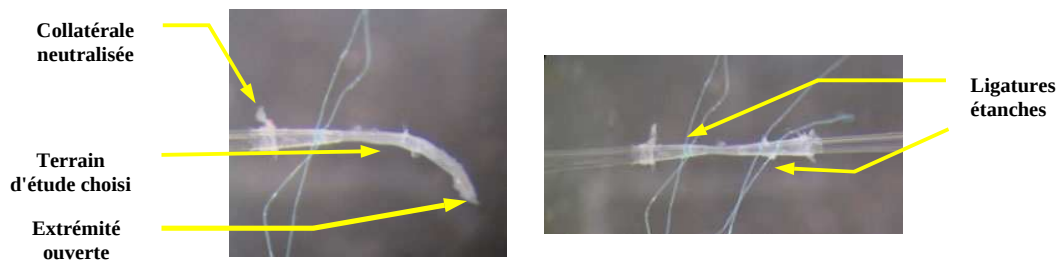


Figure 10 : Canulage de l'artère cérébrale moyenne ($\times 40$)

II.D.3. Analyse de la réactivité vasculaire

Le tonus myogénique

Ce tonus est caractéristique des artères de résistivité et permet de tester la viabilité des artères prélevées. Il se teste avec l'augmentation de la pression intraluminale par palier de 25 mmHg jusqu'à 100 mmHg, qui entraîne une contraction de l'artère pour lutter contre l'élévation de pression (figure 11). Ce phénomène est actif et implique surtout le muscle lisse (phénomène d'autorégulation). La durée des paliers, de 4 à 5 minutes, permet l'apparition d'un état stable. Afin d'évaluer l'amplitude de la contraction due à ce phénomène actif, il est nécessaire de mesurer l'élasticité propre du vaisseau (propriétés passives de la structure vasculaire) par la papavérine, inhibiteur non spécifique des phosphodiesterases, qui bloque la fonction contractile du muscle lisse. Pour des raisons de toxicité, la papavérine (10^{-5} M) est utilisée en fin de protocole.

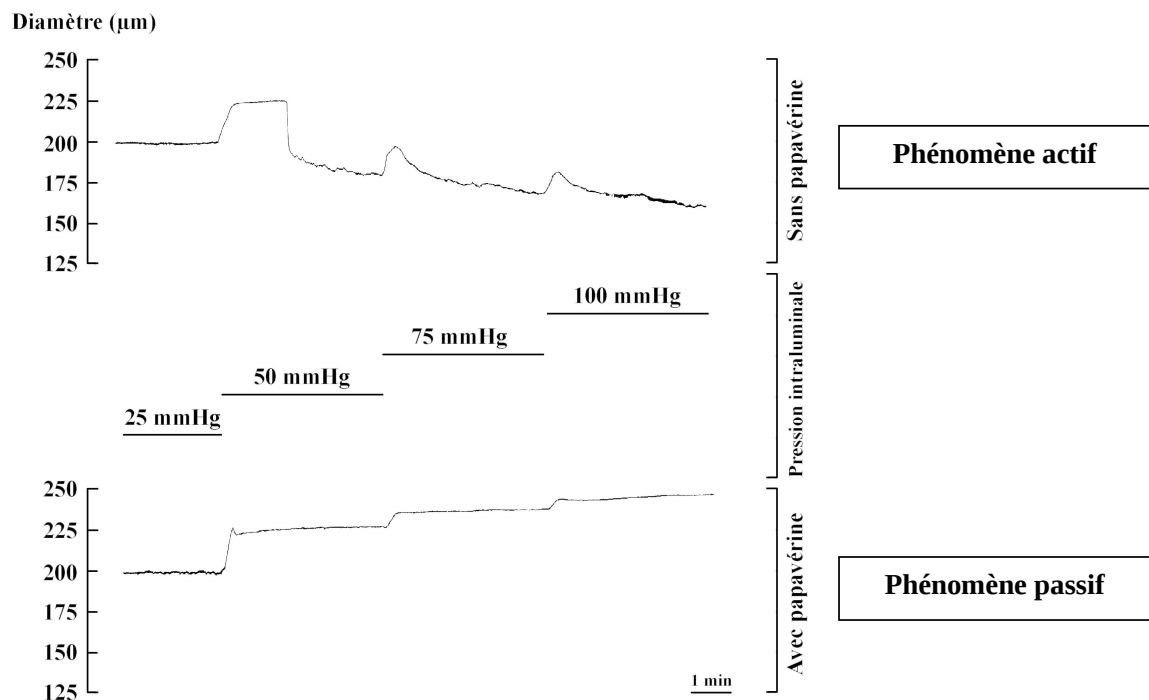


Figure 11: Etude vasculaire du tonus myogénique

Etude dose-effet des substances vasoactives

L'application de doses croissantes de sérotonine (5-HT) ou d'acétylcholine (ACh) dans la cuve de l'artériographe permet respectivement d'induire une réponse vasoconstrictrice ou vasodilatatrice dépendante de l'endothélium. Afin de s'affranchir de la libération basale de facteurs endothéliaux relaxants, une vasoconstriction maximale provoquée par une dose de sérotonine (5-HT : 1 μ M) est réalisée en préalable des doses croissantes d'acétylcholine. La relaxation endothélium-indépendante est évaluée par l'application d'une dose unique maximale de nitroprussiate de sodium (SNP 10 μ M) dans la cuve de l'artériographe précédée là encore d'une pré-constriction à la sérotonine et permet de tester l'intégrité de la fonction musculaire lisse en réponse au monoxyde d'azote (NO).

Les effets des substances sur la paroi vasculaire sont exprimés en augmentation ou en diminution de diamètre en fonction de la concentration, ce qui permet d'évaluer la dose maximale efficace, ou en pourcentage d'effet maximum afin d'obtenir la concentration pour laquelle 50 % de l'effet était obtenu (EC_{50}).

II.E. Etude in vivo de la micro circulation cérébrale :

II.E.1. Préparation de la fenêtre crânienne d'observation

L'activation leucocytaire post-ischémique est évaluée par microscopie intra vitale de fluorescence (Ritter et al, 1997; Ishikawa et al, 1999; Nevier et al, 2000). Cette technique permet l'observation de la microcirculation in vivo et en temps réel dans le territoire de l'artère cérébrale moyenne (Ritter et al, 2000). A cet effet, l'animal est placé dans un cadre stéréotaxique. Une craniotomie est réalisée sous anesthésie générale (hydrate de chloral, 300 mg/kg en intra péritonéal) grâce à une turbine dentaire (Modèle S791, Bienair, Suisse). Une fenêtre crânienne est ainsi obtenue au niveau de l'os pariétal droit à 1 mm en arrière et 4 mm en dehors du bregma (Ishikawa et al, 2005). La dure-mère est disséquée. Une chambre optique, réalisée pour l'étude (figure 12), est fixée avec du ciment acrylique sur le crâne, au dessus de la surface cérébrale exposée. Le volume de la chambre optique, fermé à sa partie supérieure par un cover-slip de 8 mm de diamètre, est alimenté par du liquide céphalo-rachidien artificiel à 37°C (Na^+ : 150 mM, K^+ : 3 mM, Ca^{2+} : 1,4mM, Mg^{2+} : 0,8mM, phosphate : 1 mM, Cl^- : 155 mM), à un débit de 1 mL/min (système de perfusion TC-324B, Warner Instruments).

L'animal ainsi préparé est positionné sous un microscope de fluorescence à source Xénon (Eclipse 50i, Nikon, France) permettant l'observation de la microcirculation cérébrale pour étude de l'interaction leucocyte-endothélium et de la réactivité vasculaire. Une période de stabilisation de 30 minutes est observée après la chirurgie du crâne avant ces évaluations. Une caméra CCD à avalanche (E2v, L3Vision, France) connectée à un enregistreur DVD (modèle H350, Sharp, France) et un moniteur (Neovo, France) permet d'enregistrer l'ensemble des images à une cadence de 25 images/s pour analyse post-expérimentation.



Figure 12 : *Chambre optique pour la microscopie intra vitale cérébrale*

(co : chambre optique ; e : entrée du LCR artificiel ; s : sortie du LCR artificiel)

II.E.2. Evaluation de l'activation leucocytaire

Pour chaque souris, l'étude est réalisée sur cinq segments artériolaires et veinulaires de 25 à 50 μm de diamètre et 100 μm de longueur, soit une surface vasculaire de l'ordre de 10^{-2} mm^2 pour chaque segment (Ritter et al, 2000). Les structures artériolaires sont facilement distinguées des structures veinulaires : une paroi plus épaisse, des trajets moins tortueux, un flux antérograde vers les éléments de diamètre plus petit. La visualisation de l'interaction leucocyte-endothélium est réalisée par marquage fluorescent in vivo. De l'acridine orange (Molecular Probes,

Invitrogen, France), marqueur fluorescent des noyaux cellulaires, est injecté par voie intra péritonéale (0,3 mL de solution à 1mg/mL). L'acridine orange diffuse en intra vasculaire et marque les leucocytes. La fluorescence induite ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) permet de visualiser le comportement leucocytaire (Neviere et al, 2000) : circulant, en phase de roulement, adhérent à l'endothélium vasculaire. Un enregistrement vidéo de 40 secondes est réalisé pour chaque segment vasculaire de 100 μm . Pour chaque enregistrement il est défini par mm^2 de surface vasculaire (calculée en supposant le vaisseau cylindrique) (Ishikawa et al, 1999):

- le nombre de leucocytes adhérents (qui restent stationnaires plus de 30s),
- le nombre de leucocytes en phase de roulement (qui parcourent le segment avec une vitesse moindre que celle des leucocytes circulants).

Les cinétiques d'activation leucocytaire sont établies dans les quatre groupes de souris grâce à des observations à 8h, 24h, 48h et 72 h de reperfusion.

II.E.3. Evaluation de la fonction endothéliale

La fonction endothéliale est évaluée par quantification grâce aux techniques de microscopie intra-vitale de la vasodilatation artériolaire acétylcholine-dépendante (Rosenblum et Wormley, 1995). La fenêtre d'observation crânienne en place, une branche de l'artère cérébrale moyenne est choisie pour son diamètre compris entre 25 et 50 μm . L'injection d'acridine orange (0.3 mL à 1mg/mL en intra péritonéal) réalise un marquage fluorescent des cellules nucléées des parois artérielles. Les images de ce vaisseau sont obtenues grâce à une caméra numérique (Coolsnap CF, Roper Scientific, France). Le diamètre artériolaire est mesuré via un réticule calibré sur le logiciel Métamorph (Molecular Imaging, Roper Scientific, France) 30 minutes après la chirurgie du crâne (diamètre basal) puis 5 minutes après l'administration topique d'acétylcholine 10-5 M (diluée dans du liquide céphalo-rachidien artificiel) (Sobey et Faraci, 1997 ; Didion et al, 2002). La réponse à l'acétylcholine est exprimée par le pourcentage de changement de diamètre par rapport au diamètre artériolaire basal. La fonction endothéliale est évaluée ainsi dans les quatre groupes de souris à 72 heures de reperfusion.

II.F. Immunohistochimie

Les rats étaient anesthésiés par injection de pentobarbital (80 mg/kg, i.p.). Une large thoraco-laparotomie était alors pratiquée. Le cœur ainsi exposée, était cathétérisé au niveau du

ventricule gauche puis une incision était réalisée au niveau de l'oreillette droit. A près un rinçage au sérum physiologique hépariné, la fixation était réalisée par perfusion de paraformaldéhyde à 4% (PFA). Les cerveaux étaient alors prélevés et plongés pendant la nuit dans du PFA à 4°C puis pendant 24h dans du sucrose à 20% et 30% à 4°C. Ensuite, les cerveaux étaient congelés dans de l'isopentane à - 30°C. Des coupes de cerveaux de 20 µm étaient réalisés au microtome.

Après fixation des coupes de cerveau dans une solution d'acétone/méthanol pendant 20 minutes, perméabilisation cellulaire, inhibition des peroxydases endogènes et blocage des sites non spécifiques, les coupes sont incubées pendant une nuit à 4°C dans une solution avec les anticorps primaires polyclonaux de lapin anti-MPO humains diluée au 1/500 (A0398, DAKO), ou un anticorps monoclonal de souris anti-OX42 (MCA 275R, Serotec), ou anti-ICAM-1 (MCA 773, Serotec), dilués au 1/500. Des coupes contrôles sont bien sur réalisées en parallèle, correspondant au témoin négatif (solution sans anticorps primaire). Le lendemain, les coupes sont incubées pendant 3heures à température ambiante dans une solution d' avec l'anticorps secondaires anti-lapin, biotinylé grâce à un sérum de chèvre. Le complexe avidine-peroxydase est ensuite fixé par un ABC kit (Vector) et l'activité enzymatique est révélée avec le diaminobenzidinetetrahydrochloride. Enfin, les coupes sont déshydratées et les lames montées de la même façon que l'histomorphométrie.

II.G. Autres paramètres

Afin de vérifier que l'injection de vinblastine ou de mAb RP3 est effectivement suivie d'une neutropénie, un prélèvement sanguin de 1ml sur tube EDTA est réalisé au moment de l'ischémie et au moment du sacrifice. La quantification des globules blancs est réalisée au microscope sur cellule de Malassez et un hémogramme est ensuite fait sur 100 cellules blanches après coloration par Giemsa (hemoquick).

III. Protocoles expérimentaux

III.A. Substances pharmacologiques

L'induction d'une neutropénie était observée à partir d'un effet secondaire majeur de la vinblastine (Vb), molécule utilisée dans le cadre du traitement de certains cancers en freinant la division cellulaire. Cette molécule dérivée de la pervenche, est un vinca-alkaloïde poison du fuseau. Le délai d'apparition de la neutropénie est de 4 jours après l'injection (i.v.) unique de la

vinblastine à la dose de 0,5 mg/kg. La veine du pénis des rats constituait le site d'injection de la vinblastine, sous anesthésie préalable, ce qui évitait d'ajouter une chirurgie invasive supplémentaire à celle de l'occlusion. Les propriétés hautement toxiques de la vinblastine nous ont conduit à éviter toute manipulation du produit (pesée et mise en solution), c'est pourquoi nous utilisons les conditionnements disponibles sur le marché sous le nom commercial Velbé®. Le produit était alors reconstitué sans risque d'exposition, avec de l'eau adaptée pour solutions injectables.

L'activation de la lignée granulocytaire se faisait à l'aide d'un facteur de croissance granulocytaire, le G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor). Il était administré sous sa forme commerciale, le filgastrim (Neupogen®), à la dose de 60 µg/kg par voie sous-cutanée 6 heures après le début de l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne.

Six heures après le début de l'ischémie, une solution résultant de l'interaction *in vitro* d'un caillot de sang et de rt-PA (Actilyse®), était administrée selon le protocole expérimental. Pour la préparation de cette solution (appelée rt-PA+TLP : *thrombus lysis products*), 0,2 mL de sang autologue était prélevé à l'animal et laissé à l'air libre pendant 5 heures, pour permettre la formation du caillot. Une dose de rt-PA de 10 mg/kg (6 mL/kg) était ensuite appliquée sur le caillot pendant 30 minutes. La solution obtenue était finalement injectée (Figure 13).

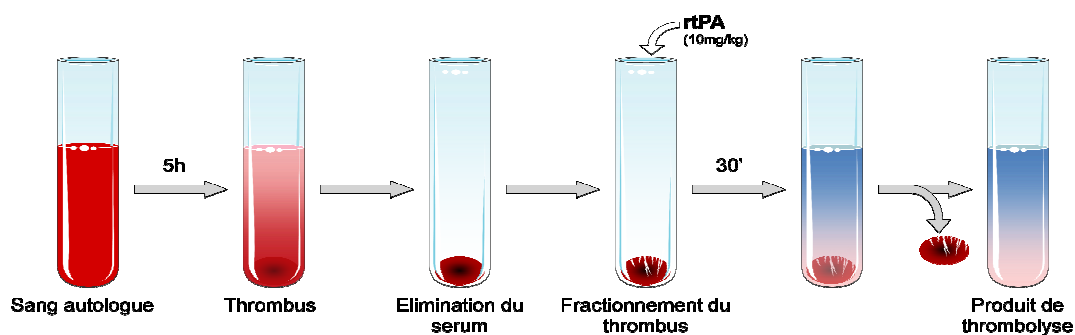


Figure 13 : Mode de préparation de la solution de TLP

Le fénofibrate (Sigma-Aldrich Chemical) est un ligand synthétique des récepteurs nucléaires PPARα. Les modalités d'administration du fénofibrate variaient selon le protocole pharmacologique envisagé. Dans les conditions d'administration post-ischémique, le fénofibrate (50 mg/kg) était dissout dans un véhicule (méthylcellulose) pour gavage biquotidien des animaux. Dans les conditions de traitement pré-ischémique de 14 jours, le fénofibrate était contenu dans la nourriture des rats (granulés 0,2 % fénofibrate) et la dose correspondait en moyenne à 200 mg/kg pour chaque rat.

L'atorvastatine est un inhibiteur de l'HMG CoA. Les modalités d'administration de l'atorvastatine variaient selon le protocole pharmacologique envisagé. Dans les conditions d'administration post-ischémique, l'atorvastatine était dissout dans un véhicule (méthylcellulose) pour gavage biquotidien des animaux. Deux doses ont été administrées : 10 et 20 mg/kg/jour. Dans les conditions de traitement pré-ischémique de 14 jours, l'atorvastatine était contenu dans la nourriture des rats (granulés 0,01 ou 0,02% d'atorvastatine) et les doses correspondaient en moyenne à 10 et 20 mg/kg/jour respectivement chaque rat.

III.B. Etude du rôle du polynucléaire neutrophile dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et des complications hémorragiques

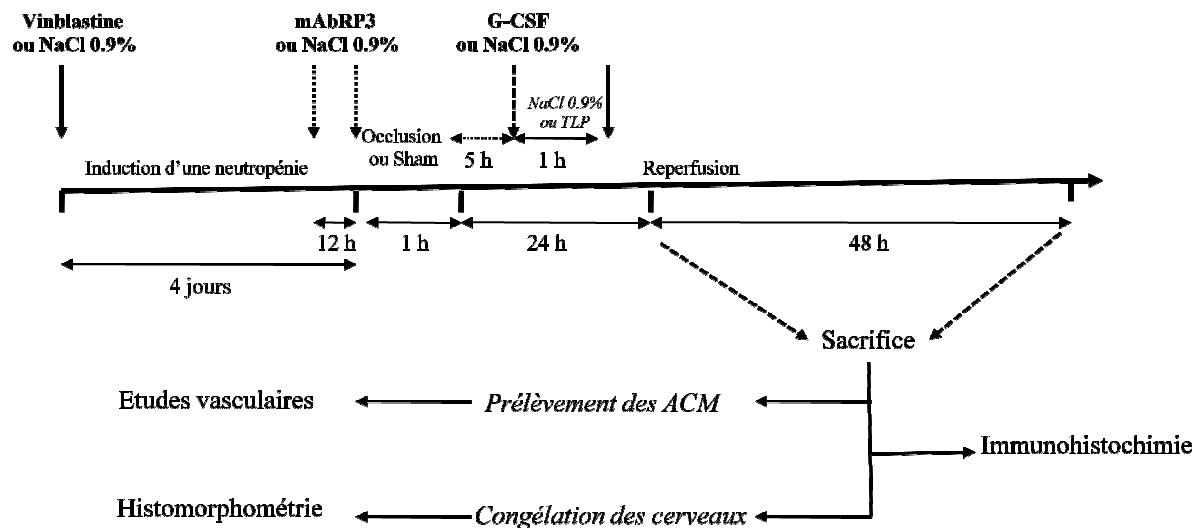


Figure 14 : Protocoles expérimentaux pour étudier le rôle du polynucléaire neutrophile

III.C. Etude de la modulation des interactions leucocyte-endothélium par les récepteurs nucléaires PPAR- α

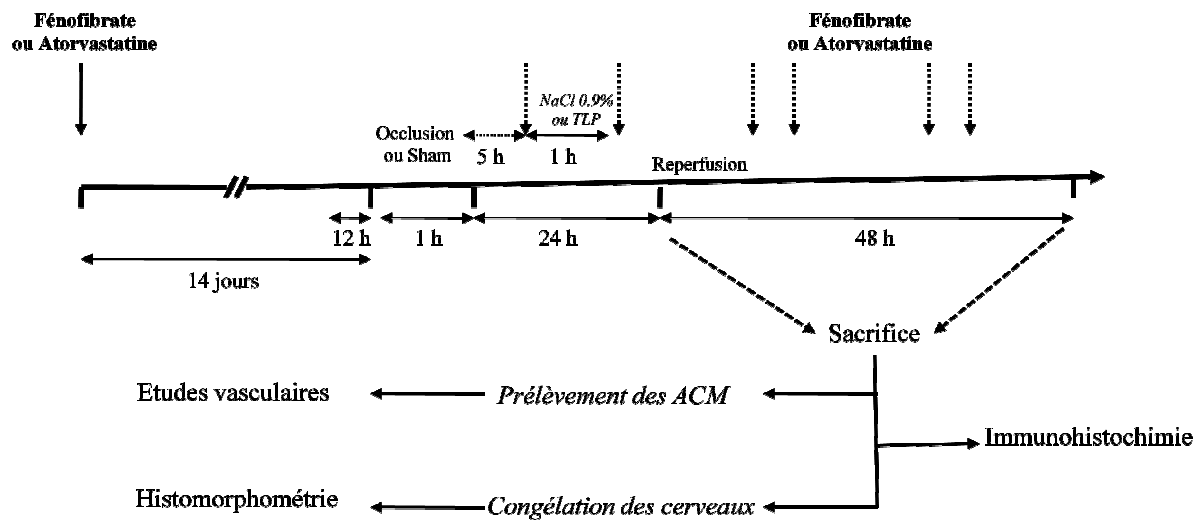


Figure 15 : Protocoles expérimentaux pour étudier la modulation des interactions leucocyte-endothélium par les récepteurs PPARs

IV. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de pourcentages ou de valeurs moyennes $\pm$ l'erreur standard. Les comparaisons de fréquences ont été réalisées au moyen du test du χ^2 (avec correction de Yates si nécessaire). Les comparaisons de moyennes ont été effectuées par une analyse de variance (ANOVA) suivie, en cas de différence significative, d'une analyse post-hoc par le test PLSD (*protected least significant difference*) de Fisher. Le seuil de significativité pour les tests statistiques était de 5 % ($p < 0,05$).

RESULTATS

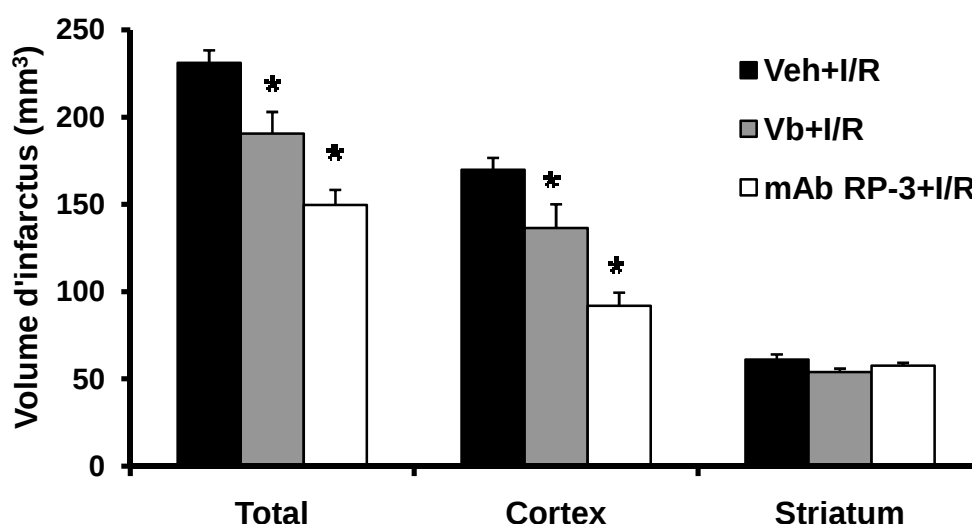
I. Rôle du polynucléaire neutrophile dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et des complications hémorragiques de la thrombolyse

Pour déterminer l'implication des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et dans celle des complications hémorragiques induites par le rt-PA, deux approches pharmacologiques ont été envisagées : (i) une neutropénie pharmacologiquement induite par l'administration de vinblastine ou d'un anticorps monoclonal mAb RP3 préalablement à la réalisation de l'ischémie cérébrale ; (ii) une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles circulants par l'administration de G-CSF 6 heures après le début de l'ischémie cérébrale.

I.A. Effet d'une déplétion et/ou d'une inactivation

I.A.1. Effet sur les lésions parenchymateuses et vasculaires

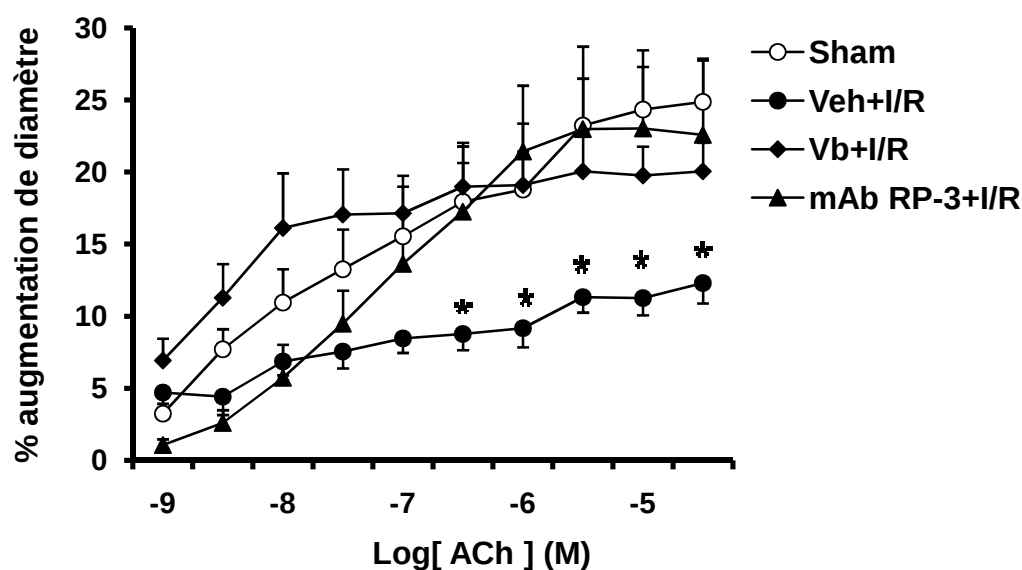
Après la réalisation d'une ischémie suivie de 24 heures de reperfusion, l'installation d'une neutropénie était parallèle à la mise en place d'une protection cérébrale en terme de diminution du volume d'infarctus (Veh+I/R : $231.1 \pm 7.2 \text{ mm}^3$ versus Vb+I/R : $190.5 \pm 12.5 \text{ mm}^3$ et mAb RP3+I/R : $149.7 \pm 8.6 \text{ mm}^3$, $p < 0.05$). Ces protections cérébrales se localisaient dans la région corticale (figure 16).



* $p < 0.05$ versus Veh+I/R

Figure 16 : Effet d'une déplétion et/ou d'une inactivation des polynucléaires neutrophiles sur le volume d'infarctus

Parallèlement aux diminutions des volumes d'infarctus consécutives à la neutropénie induites soit par la vinblastine soit par l'anticorps mAb RP3, la dysfonction endothéliale post-ischémique était intégralement prévenue comme le montre l'absence de différence entre la relaxation maximale des artères prélevées sur des animaux non ischémiés et celles issues d'animaux ischémiés et traités par la vinblastine (Vb+I/R : 19.8 ± 2.0 versus Veh+Sham : 24.3 ± 2.9 , $p < 0.05$) ou par l'anticorps mAb RP3 (mAb RP3 + I/R : 23.0 ± 5.4) (figure 17).



* $p < 0.05$ versus Sham

Figure 17 : Effet d'une déplétion et/ou d'une inactivation des polynucléaires neutrophiles sur la relaxation endothélium-dépendante

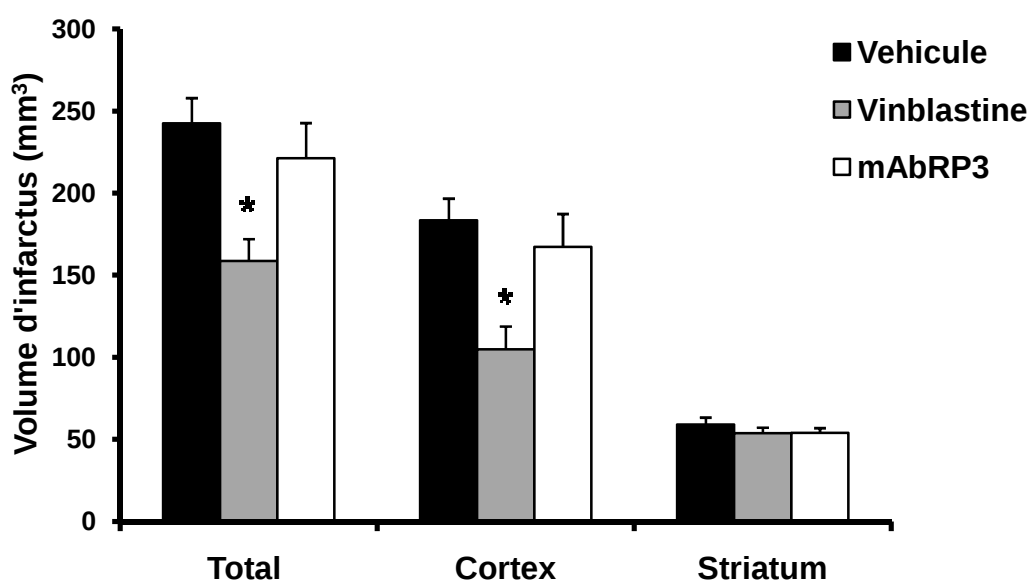
La réponse contractile à la sérotonine et la relaxation endothélium-indépendante étaient similaires dans les quatre groupes (Tableau 5).

	Sham	Veh+I/R	Vb+I/R	mAb RP-3+I/R
5-HT 1 μ M (% constriction)	29.6 ± 2.0	29.8 ± 2.0	27.5 ± 4.5	33.3 ± 5.6
SNP 10 μ M (% relaxation)	58.4 ± 5.2	52.5 ± 4.9	50.4 ± 6.0	55.7 ± 12.0

Tableau 5 : Effet d'une déplétion et/ou d'une inactivation des polynucléaires neutrophiles sur la réactivité vasculaire

I.A.2. Effet sur les complications hémorragiques

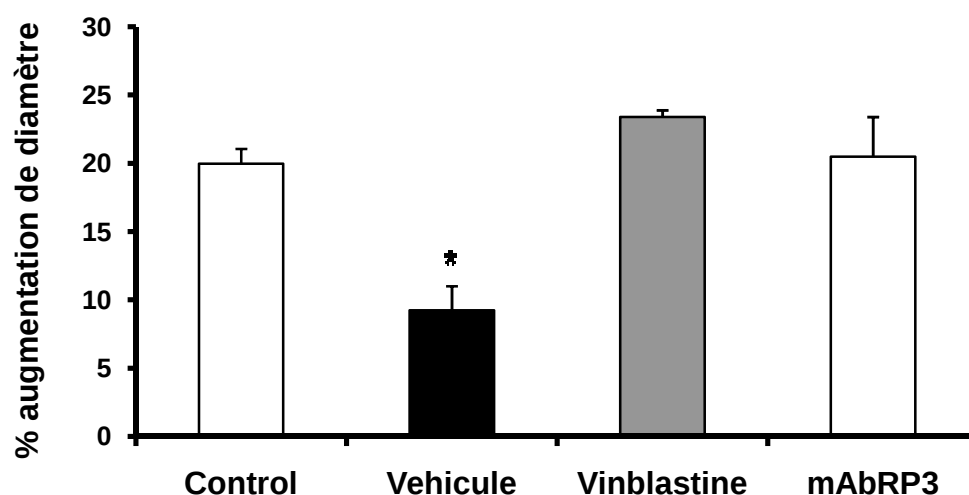
La déplétion en polynucléaires neutrophiles induite par la vinblastine entraînait une diminution significative des volumes d'infarctus totaux et corticaux ($158.6 \pm 13.4 \text{ mm}^3$ et $104.8 \pm 14.0 \text{ mm}^3$ respectivement chez les animaux traités par la vinblastine *versus* $242.5 \pm 15.5 \text{ mm}^3$ et $183.4 \pm 13.3 \text{ mm}^3$ chez les animaux traités par le véhicule; $p < 0.01$). La déplétion en polynucléaires neutrophiles induite par l'anticorps monoclonal mAbRP3 n'était pas associée avec une diminution significative des volumes d'infarctus totaux, corticaux et striataux ($221.2 \pm 21.6 \text{ mm}^3$ and $167.3 \pm 20.1 \text{ mm}^3$) (Figure 18).



* $p < 0.01$ versus Vehicule

Figure 18 : Effet d'une déplétion et/ou d'une inactivation des polynucléaires neutrophiles sur le volume d'infarctus dans un modèle de complications hémorragiques

Comme observé chez les animaux traités par le véhicule, l'ischémie-reperfusion associée à la perfusion de la solution de TLP induisait une perte significative de la relaxation endothélium-dépendante à l'acétylcholine en comparaison des animaux contrôle. Cette dysfonction endothéliale était significativement prévenue par la déplétion en polynucléaires neutrophiles ($p < 0.05$). La sensibilité à l'acétylcholine était diminuée durant l'ischémie-reperfusion et la perfusion de TLP, mais cette diminution était prévenue quand la déplétion en polynucléaires neutrophiles était induite ($p < 0.05$) (figure 19) (tableau 6).



*p<0.05 versus control

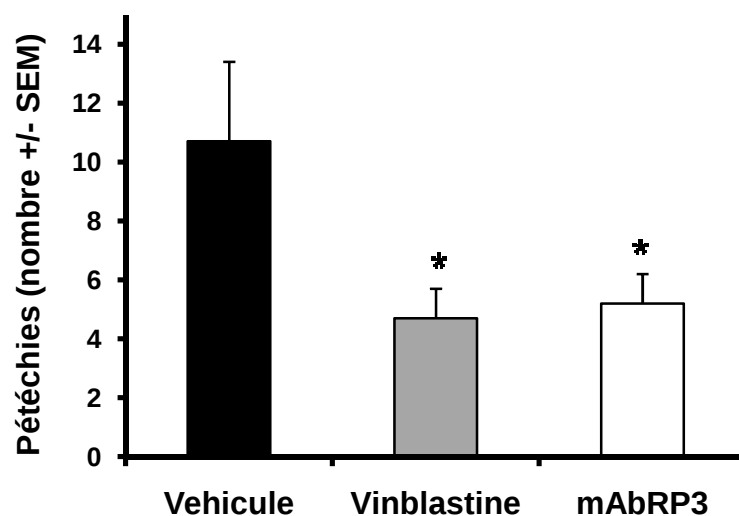
Figure 19 : Effet d'une déplétion et/ou d'une inactivation des polynucléaires neutrophiles sur la relaxation endothélium-dépendante dans un modèle de complications hémorragiques

	Control	Vehicule	Vinblastine	mAb RP3
EC 50 (μM)	0.036 ± 0.008	0.127 ± 0.027*	0.019 ± 0.010	0.005 ± 0.002
5-HT 1 μM (% constriction)	29.4 ± 3.8	34.6 ± 2.9	39.1 ± 3.1	33.4 ± 4.2
SNP 10 μM (% relaxation)	58.4 ± 5.2	46.1 ± 12.6	66.0 ± 11.6	66.7 ± 19.7

*p<0.05 versus control

Tableau 6 : Effet d'une déplétion et/ou d'une inactivation des polynucléaires neutrophiles sur la réactivité vasculaire dans un modèle de complications hémorragiques

Les hémorragies intracérébrales induites par le t-PA étaient confinées dans la zone infarctée. Chez les rats traités par le véhicule, l'ischémie-reperfusion et la perfusion de TLP induisait des hémorragies pétéchiales (10.0 ± 3.0 pétéchies). La déplétion en polynucléaires neutrophiles était associée avec une réduction de l'incidence des hémorragies (-33% and -29% respectivement). Lorsqu'ils étaient observés, le nombre de pétéchies était significativement diminué après une déplétion en polynucléaires neutrophiles (3.2 ± 1.1 pétéchies dans le groupe vinblastine et 3.7 ± 1.2 pétéchies dans le groupe mAbRP3, $p < 0.05$). Aucun hématome n'était visible (figure 20).



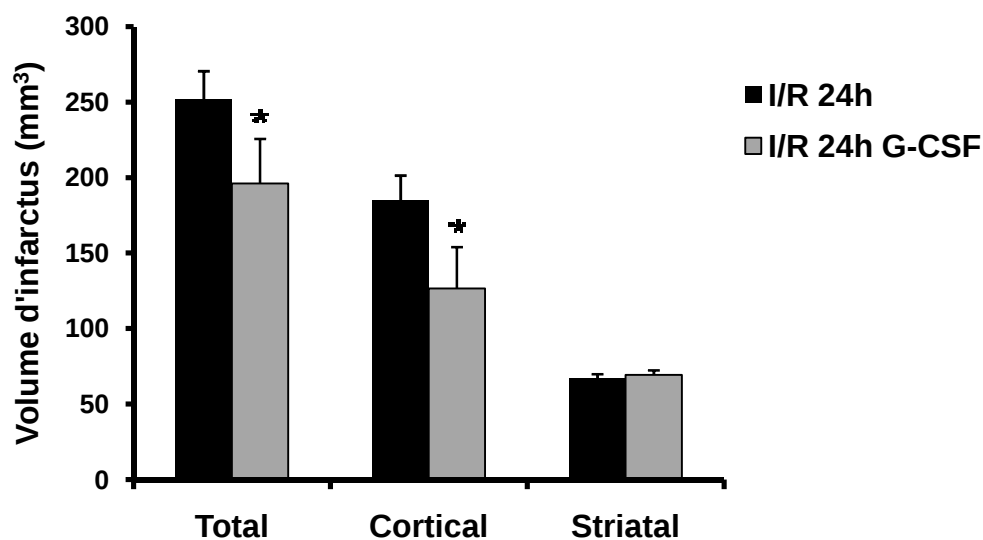
*p<0.05 versus vehicule

Figure 20 : Effet d'une déplétion et/ou d'une inactivation des polynucléaires neutrophiles sur les complications hémorragiques

I.B. Effet d'une activation de la lignée granulocytaire par le G-CSF

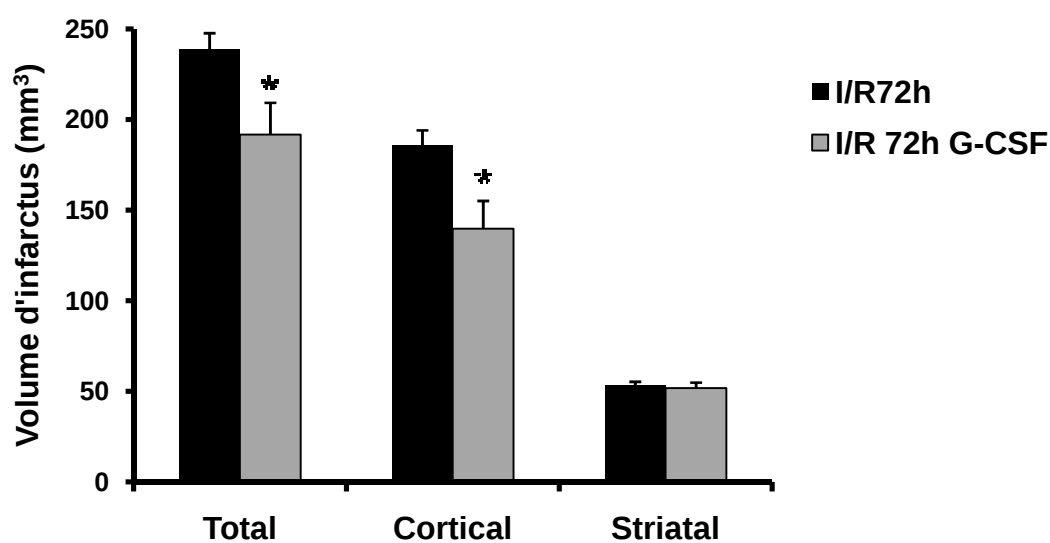
I.B.1. Effet sur les lésions parenchymateuses et vasculaires

L'administration de G-CSF (60µg/kg) chez des rats normotendus soumis à une ischémie, 6 heures après le début de l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, induisait une réduction de la taille d'infarctus ($139.7 \pm 23.0 \text{ mm}^3$ dans le groupe traité par le G-CSF *versus* $194.0 \pm 10.4 \text{ mm}^3$ dans le groupe traité par le véhicule, $p<0.05$) après 24 heures de reperfusion (figure 21). Ce niveau de protection était comparable après 72 heures de reperfusion ($136.1 \pm 15.2 \text{ mm}^3$ dans le groupe traité par le G-CSF *versus* $182.7 \pm 8.5 \text{ mm}^3$ dans le groupe traité par le véhicule ; $p<0.05$) (figure 22).



*p<0.05 versus I/R 24h

Figure 21 : Effet du G-CSF sur le volume d'infarctus après 24 heures de reperfusion



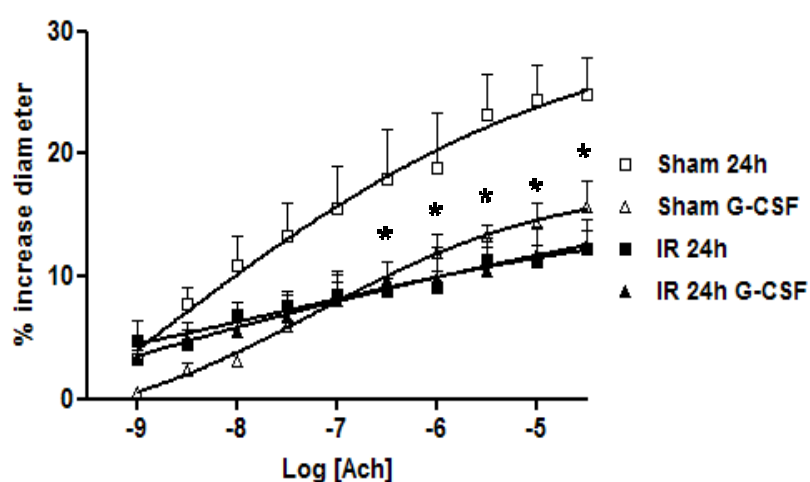
*p<0.05 versus I/R 72h

Figure 22 : Effet du G-CSF sur le volume d'infarctus après 72 heures de reperfusion

Chez les animaux sham, l'administration de G-CSF 5 heures après le début de la reperfusion, provoquait une altération de la relaxation endothélium-dépendante en comparaison des animaux sham recevant le véhicule ($p<0.05$). Cet effet vasculaire était plus prononcé après 24 heures de reperfusion qu'après 72 heures.

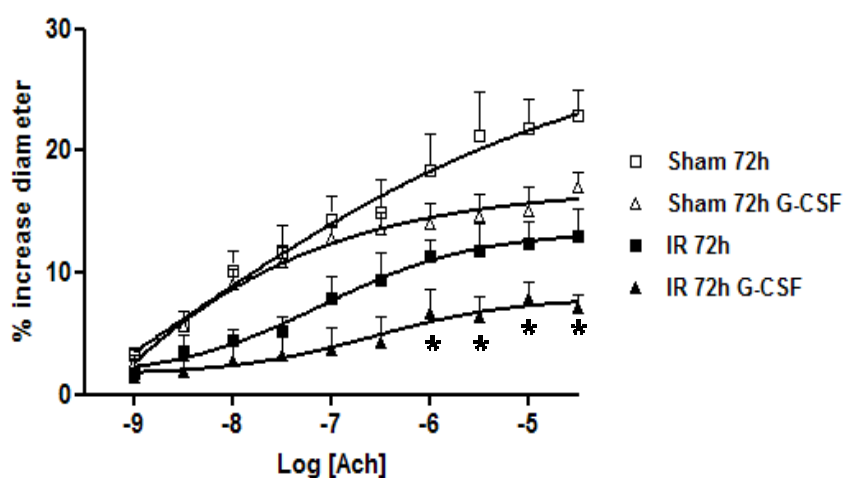
La relaxation endothélium-dépendante induite par l'acétylcholine est significativement altérée ($p < 0.05$) chez les animaux ayant subi une ischémie et une reperfusion. Cette altération induite par le processus d'ischémie-reperfusion était comparable, après 24 heures de reperfusion, à l'altération de la relaxation endothélium-dépendante induite par le G-CSF chez les animaux sham (figure 23). Elle se maintenait à un niveau égal après 72 heures d'ischémie-reperfusion (figure 24).

L'administration de G-CSF ne prévenait pas la dysfonction endothéliale post-ischémique, voire entraînait une majoration de l'altération de la relaxation endothélium-dépendante, non observée après 24 heures de reperfusion mais significative après 72 heures d'ischémie-reperfusion.



* $p < 0.05$ versus Sham 24h

Figure 23 : Effet du G-CSF sur la relaxation endothélium-dépendante à 24 heures



* $p < 0.05$ versus Sham 72h

Figure 24 : Effet du G-CSF sur la relaxation endothélium-dépendante à 72 heures

Un traitement par vinblastine, 4 jours avant l'administration de G-CSF, prévenait la dysfonction endothéliale induite par le G-CSF chez les animaux sham (figure 25).

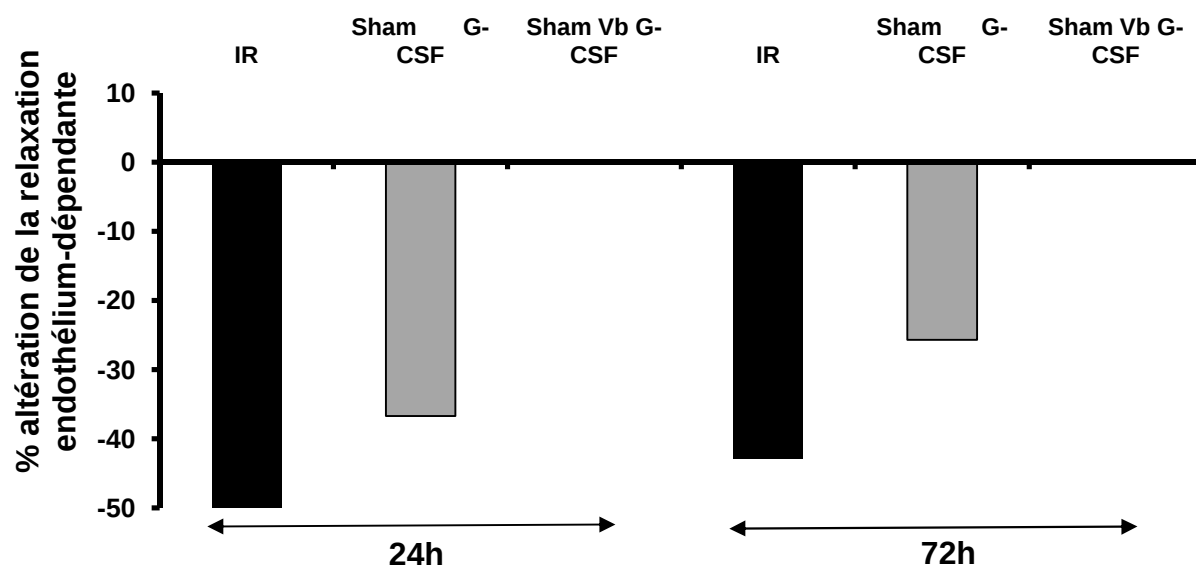


Figure 25 : Effet du G-CSF sur la relaxation endothélium-dépendante après une neutropénie induite par la vinblastine

Les animaux ischémiés et perfusés par une solution de TLP présentait des complications hémorragiques avec une incidence et une sévérité plus importante après 72 heures d'ischémie/reperfusion lorsque la perfusion de la solution de thrombolyse a été précédée d'une administration de G-CSF, comme en témoignaient un nombre plus important de pétéchies (10.3 ± 1.8 pétéchies chez les animaux traités par G-CSF *versus* 4.1 ± 0.9 pétéchies chez les animaux traités par le véhicule, $p < 0.05$) et la présence inhabituelle d'hématomes (quatre animaux traités par le G-CSF *versus* aucun animal traité par le véhicule) (tableau 7) (figure 26).

	Score histologique			Sévérité
	0 = pas de pétéchies	1 = pétéchies	2= hématome	Nombre moyen de pétéchies $\pm$ SEM
Vehicule (n=9)	1	8	0	4.1 ± 0.9
G-CSF (n=10)	0	10	4	$10.3 \pm 1.8^*$

* $p < 0.05$ *versus* vehicule

Tableau 7 : Effet du G-CSF sur les complications hémorragiques

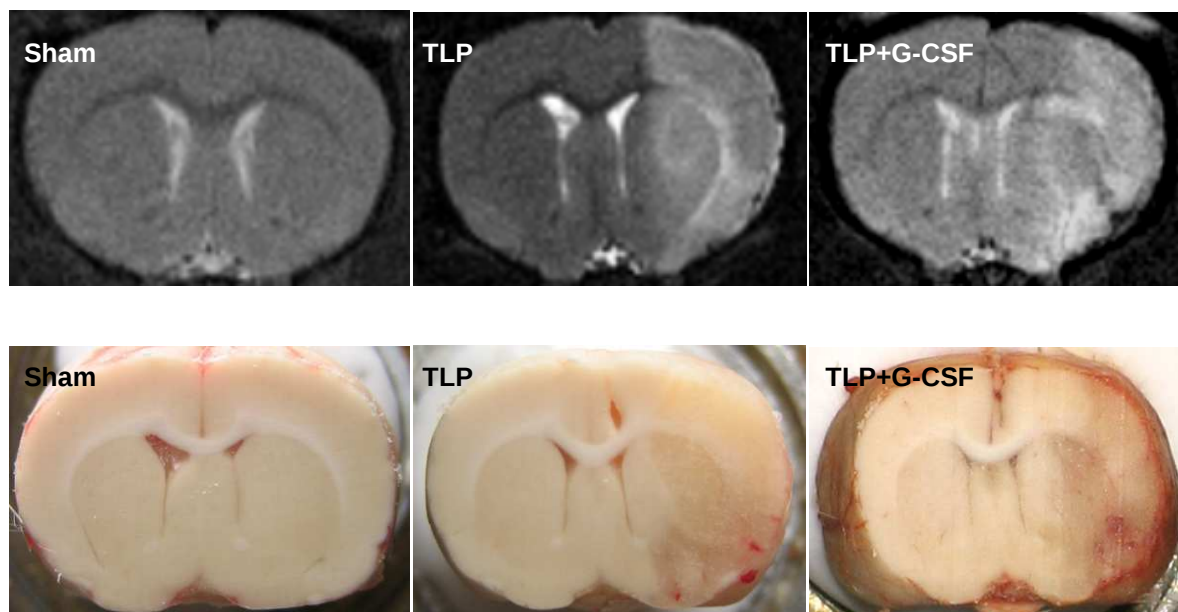
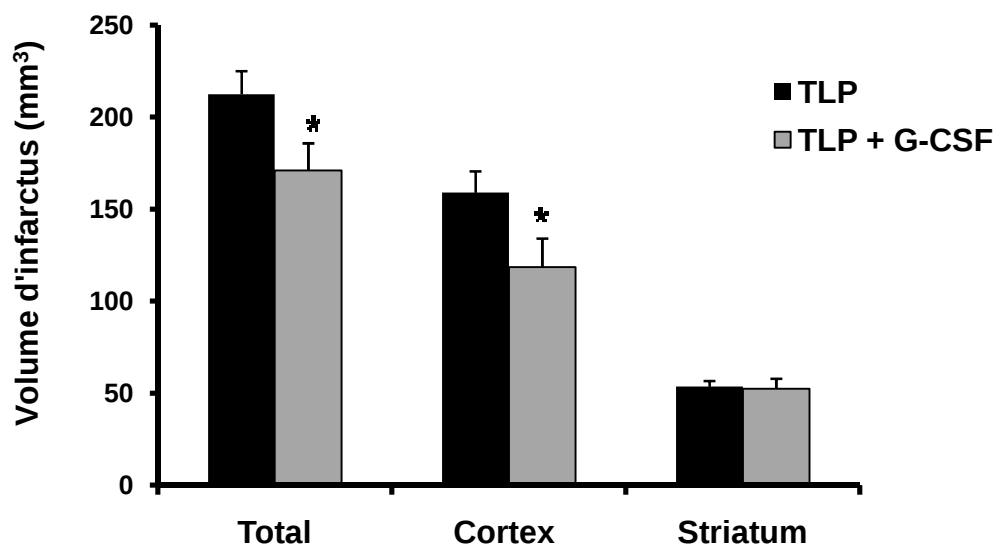


Figure 26 : Effet du G-CSF sur les complications hémorragiques visualisées par IRM ou sur coupes histologiques

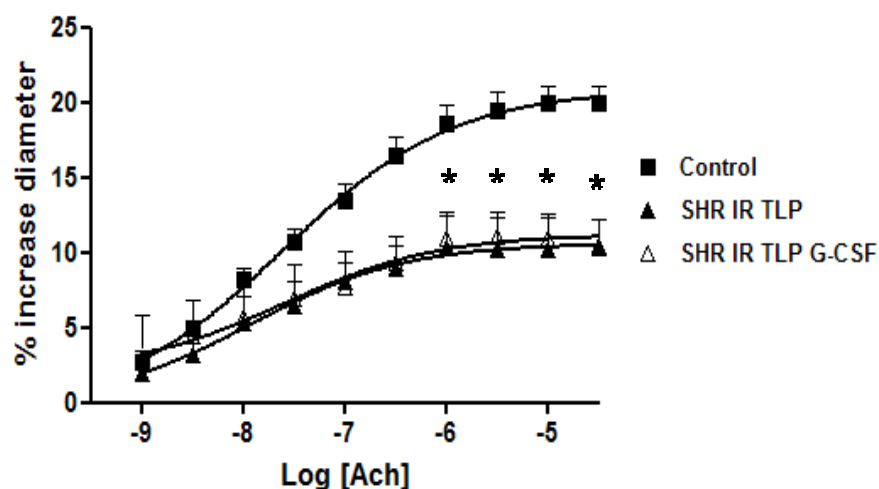
En parallèle, le G-CSF dans ce modèle induisait une réduction significative de la taille d'infarctus ($98.7 \pm 13.3 \text{ mm}^3$ chez les animaux traités par G-CSF *versus* $153.7 \pm 12.2 \text{ mm}^3$ chez les animaux traités par le véhicule, $p < 0.05$) (figure 27).



* $p < 0.05$ versus TLP

Figure 27 : Effet du G-CSF sur le volume d'infarctus après 72 heures de reperfusion dans un modèle de complications hémorragiques

Un traitement par G-CSF ne modifiait pas l'altération de la relaxation endothélium-dépendante induite par l'ischémie et la perfusion de TLP (figure 28).

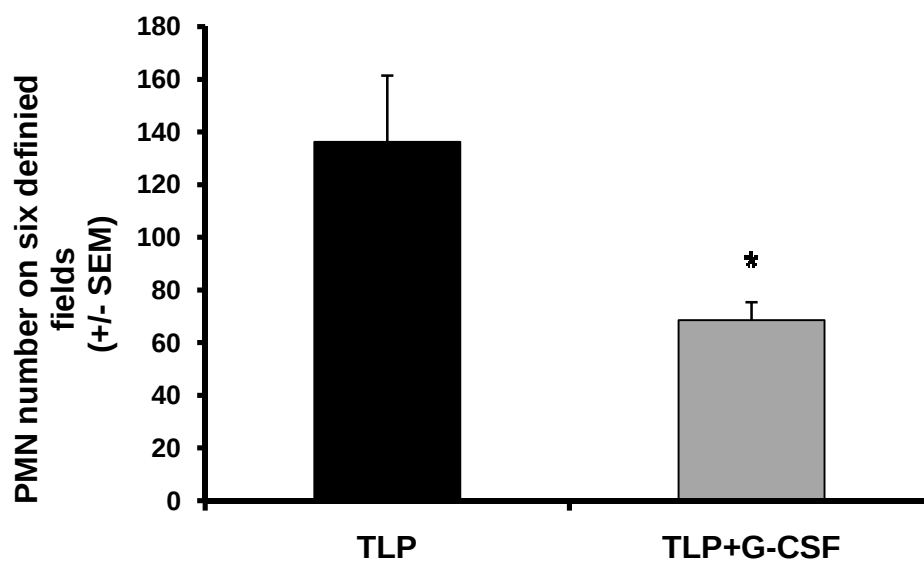


* $p < 0.05$ versus control

Figure 28 : Effet du G-CSF sur la relaxation endothélium-dépendante après 72 heures de reperfusion dans un modèle de complications hémorragiques

Enfin, l'administration de G-CSF dans ce modèle diminuait de façon significative l'infiltration des polynucléaires dans la zone infarctée (68.5 ± 6.9 PMN chez les animaux traités par G-CSF *versus* 136.2 ± 25.2 PMN chez les animaux traités par le véhicule, $p < 0.05$) (figure 29).





*p<0.05 versus TLP

Figure 29 : Effet du G-CSF sur l'infiltration des polynucléaires neutrophiles

II. Modulation pharmacologique des interactions leucocytes-endothélium par les récepteurs nucléaires PPARs dans l'ischémie cérébrale et les complications hémorragiques de la thrombolyse

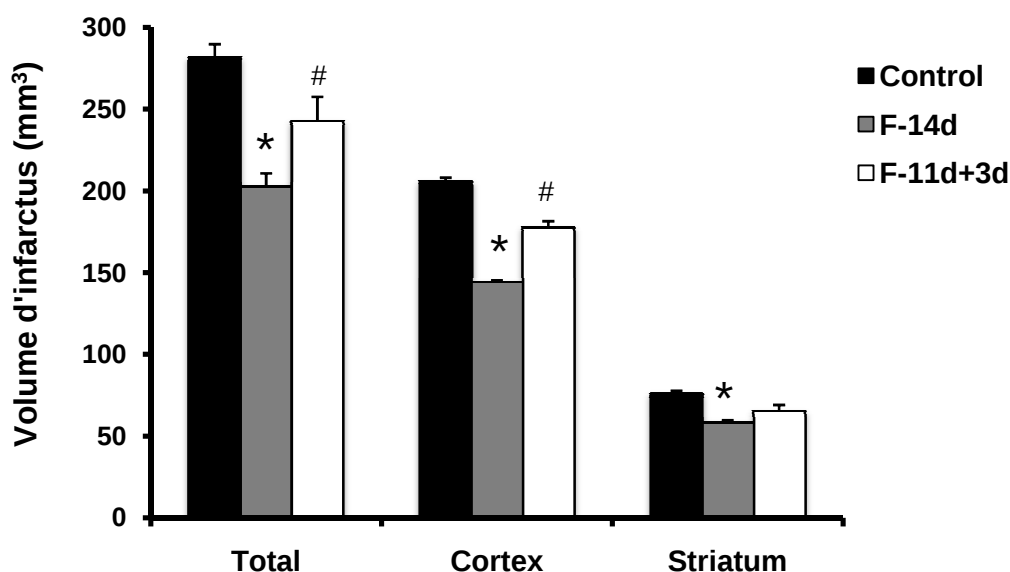
II.A. Modulation par une approche préventive

II.A.1. Effets d'une modulation directe par le fénofibrate

Le fénofibrate diminuait de manière significative le volume d'infarctus total en comparaison des animaux non traités ($202.3 \pm 8.5 \text{ mm}^3$ dans le groupe F-14d *versus* $281.5 \pm 8.2 \text{ mm}^3$ dans le groupe control, $p < 0.05$). Cet effet neuroprotecteur du fénofibrate était significatif aussi bien au niveau cortical ($144.0 \pm 1.3 \text{ mm}^3$ dans le groupe F-14d *versus* $206.0 \pm 2.2 \text{ mm}^3$) qu'au niveau striatal ($58.3 \pm 1.2 \text{ mm}^3$ *versus* $75.6 \pm 2.2 \text{ mm}^3$) (figure 30).

Pour évaluer l'effet de l'arrêt du traitement par fénofibrate, les rats étaient traités pendant 11 jours. Dès lors le traitement était interrompu 3 jours avant l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne. L'arrêt du traitement par fénofibrate entraînait une perte de neuroprotection en comparaison des animaux traités par fénofibrate pendant 14 jours ($242.5 \pm 15.0 \text{ mm}^3$ dans le groupe F-11J+3d *versus* $202.3 \pm 8.5 \text{ mm}^3$ dans le groupe F-14d). Une activation des récepteurs

PPAR- α pendant 11 jours permettait néanmoins une réduction significative du volume d'infarctus total par rapport aux animaux non traités.

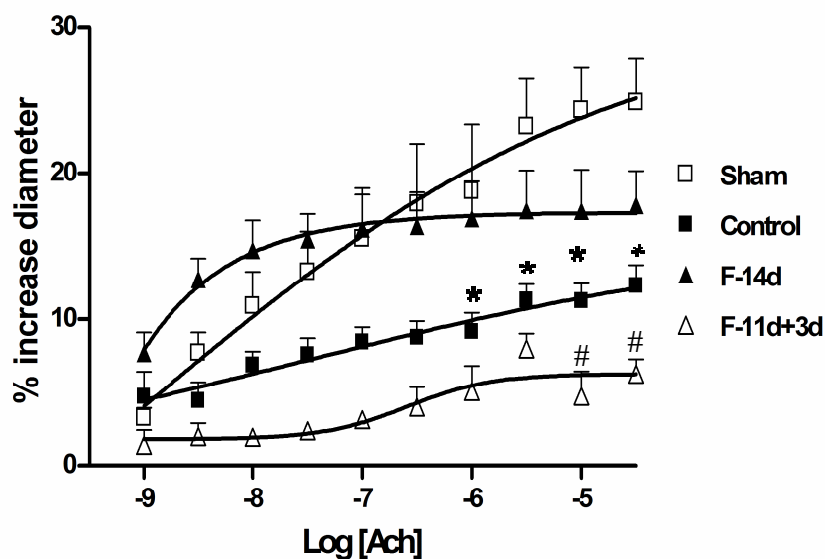


* $p < 0.05$ versus control ; # versus F-14d

Figure 30 : Effet préventif du fénofibrate sur le volume d'infarctus

La relaxation endothélium-dépendante chez les animaux non traités étaient altérée en comparaison des animaux sham. Un traitement préventif par fénofibrate pendant 14 jours prévenait la dysfonction endothéliale induite par l'ischémie/reperfusion (figure 31).

L'interruption du traitement préventif par fénofibrate 3 jours avant l'ischémie/reperfusion induisait une perte de protection de la relaxation endothélium-dépendante en comparaison des animaux traités par fénofibrate pendant 14 jours. Cet arrêt de traitement par fénofibrate entraînait une aggravation de la dysfonction endothéliale déjà induite par l'ischémie-reperfusion.



* $p < 0.05$ versus sham ; # $p < 0.05$ versus control

Figure 31 : Effet préventif du fénofibrate sur la relaxation endothélium-dépendante

L'ischémie-reperfusion focale induisait une augmentation de l'expression d'ICAM-1 (figure 32) parallèlement à une augmentation significative de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le parenchyme cérébral (figure 33) ainsi qu'une activation microgliale (figure 34). L'activation des récepteurs nucléaires PPAR- α par le fénofibrate pendant 14 jours avant le processus d'ischémie-reperfusion prévenait conjointement l'expression d'ICAM-1, l'infiltration des polynucléaires neutrophiles et l'activation microgliale post-ischémiques.

L'expression d'ICAM-1, le nombre de polynucléaires neutrophiles infiltrés et de cellules microgliales activées étaient également prévenus par un traitement par fénofibrate pendant 11 jours. L'arrêt du traitement par fénofibrate 3 jours avant l'ischémie n'entraînait pas de différence significative sur ces marqueurs de l'inflammation post-ischémique en comparaison des animaux traités pendant 14 jours.

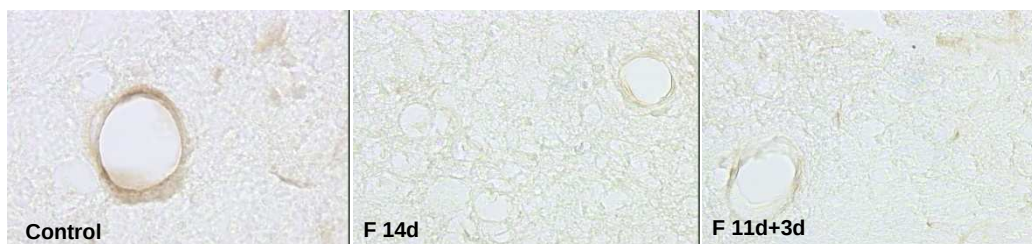
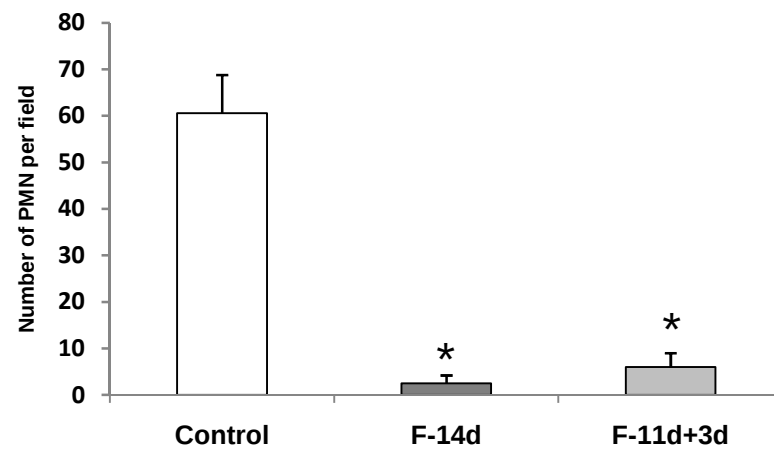
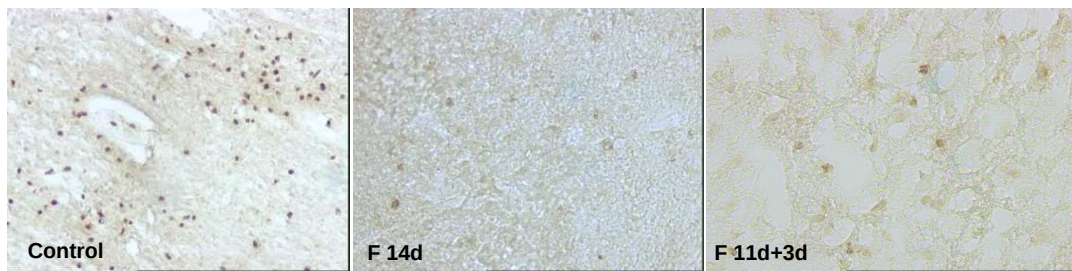
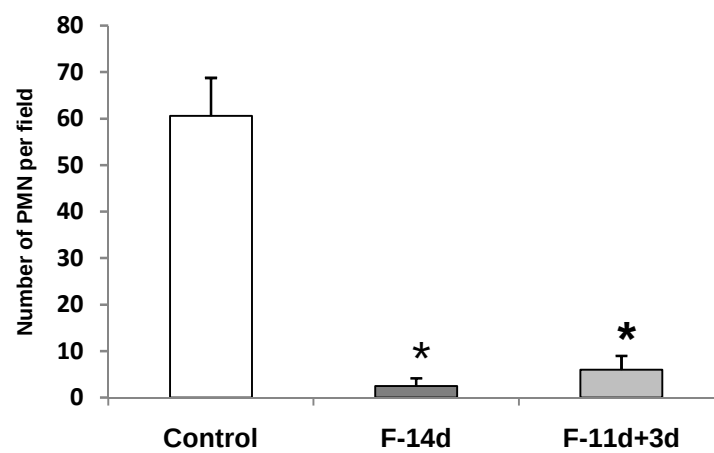
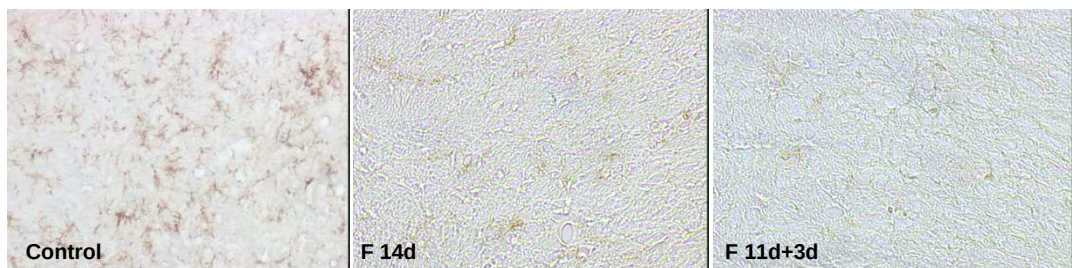


Figure 32 : Effet préventif du fénofibrate sur l'expression d'ICAM-1



*p<0.05 versus control

Figure 33 : Effet préventif du fénofibrate sur l'expression de la MPO

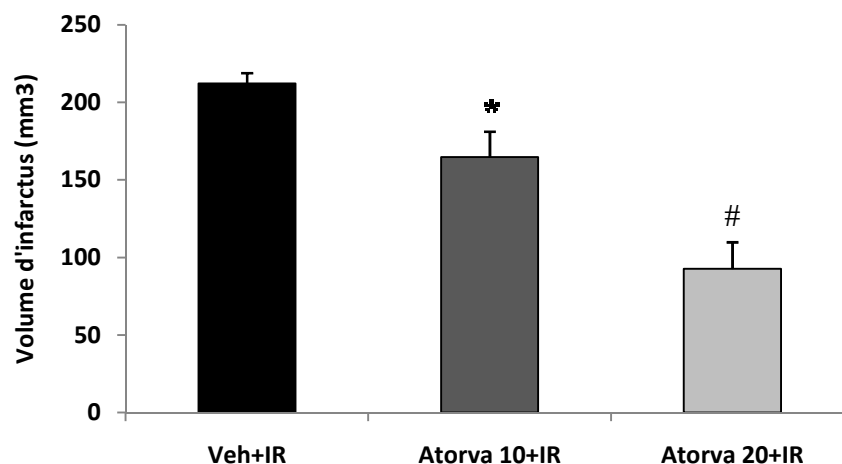


*p<0.05 versus control

Figure 34 : Effet préventif du fénofibrate sur l'expression d'Ox-42

II.A.1. Effets d'une modulation indirecte par l'atorvastatine

Un traitement par atorvastatine diminuait de manière dose-dépendante et significative le volume d'infarctus total en comparaison des animaux non traités (Atorva 10+I/R : 164.6 ± 16.5 mm³ et Atorva 20+I/R : 92.6 ± 17.2 versus 212.2 ± 6.6 mm³ dans le groupe Veh+IR, $p < 0.05$) (figure 35).



* $p < 0.05$ versus Veh+IR ; # $p < 0.01$ versus Veh+IR

Figure 35 : Effet préventif de l'atorvastatine sur le volume d'infarctus

Un traitement par atorvastatine pendant 14 jours avant la réalisation de l'ischémie diminuait de manière significative le volume d'infarctus chez les souris sauvages. Cette neuroprotection abolie chez les souris PPAR- α KO (figure 36).

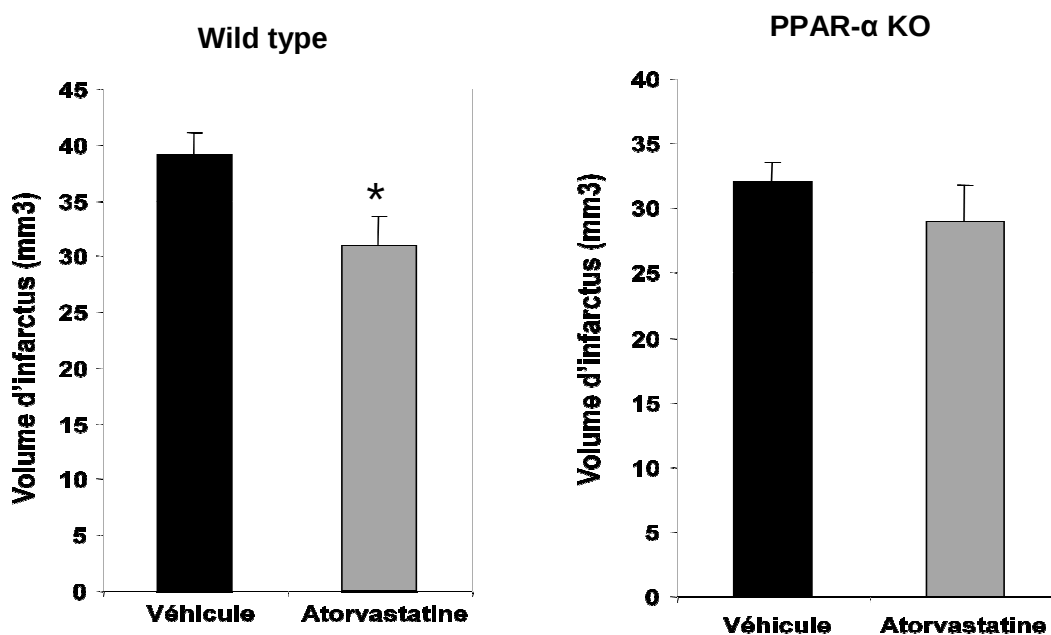
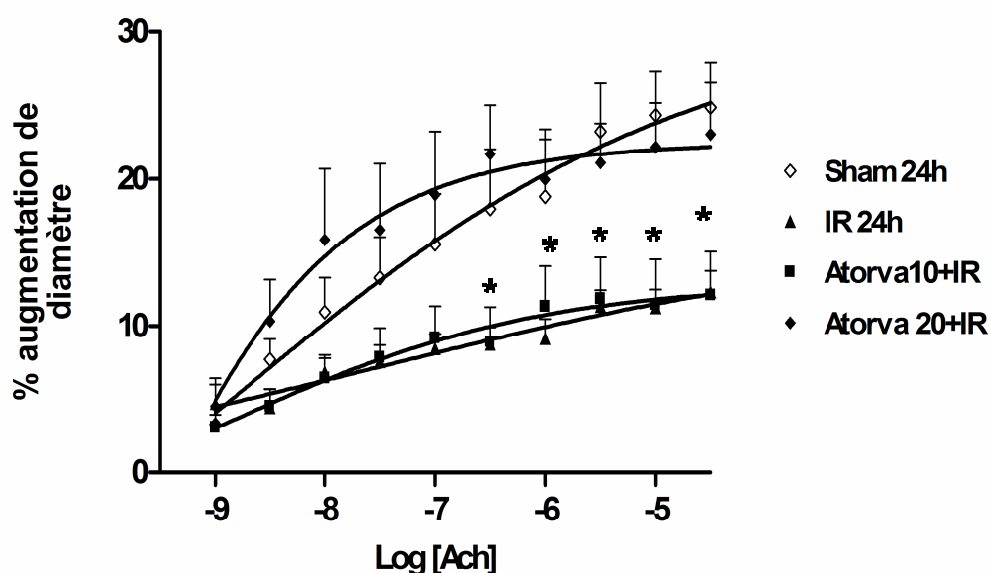


Figure 36 : Effet préventif de l'atorvastatine sur le volume d'infarctus chez des souris sauvages et PPAR- α KO

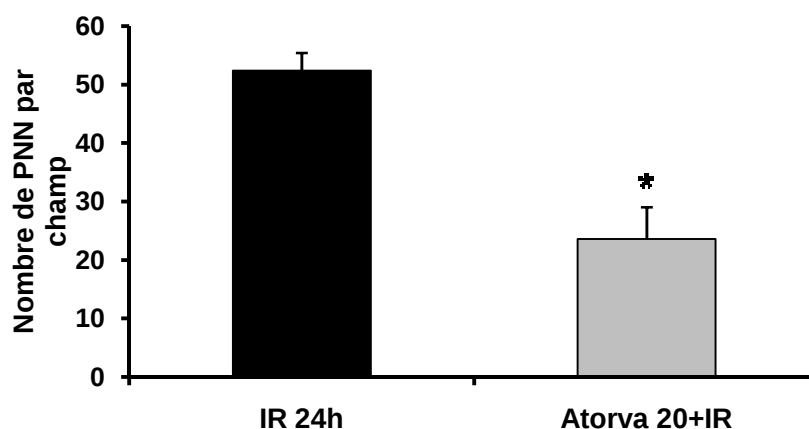
La relaxation endothélium-dépendante chez les animaux non traités étaient altérée en comparaison des animaux sham (IR 24h : 12.3 ± 1.4 , $p < 0.05$). Un traitement préventif par atorvastatine à la dose de 20 mg/kg/jour pendant 14 jours prévenait la dysfonction endothéliale induite par l'ischémie/reperfusion (Atorva 20+IR : 23.0 ± 3.5 versus Veh+Sham : 26.1 ± 2.7) (figure 37).



* $p < 0.05$ versus Sham 24h

Figure 37 : Effet préventif de l'atorvastatine sur la relaxation endothélium-dépendante

L'administration d'atorvastatine 14 jours avant la réalisation de l'ischémie cérébrale prévenait de manière significative l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le tissu ischémié (figure 38).



* $p < 0.05$ versus Sham 24h

Figure 38 : Effet préventif de l'atorvastatine sur l'infiltration des polynucléaires neutrophiles

II.B. Modulation par une approche curative aiguë

II.B.2. Effets d'une modulation directe par le fénofibrate

Le fénofibrate diminuait de manière significative le volume d'infarctus en comparaison du véhicule ($182.7 \pm 17.6 \text{ mm}^3$ in IR+Feno50 group, $p < 0,05$) (figure 39).

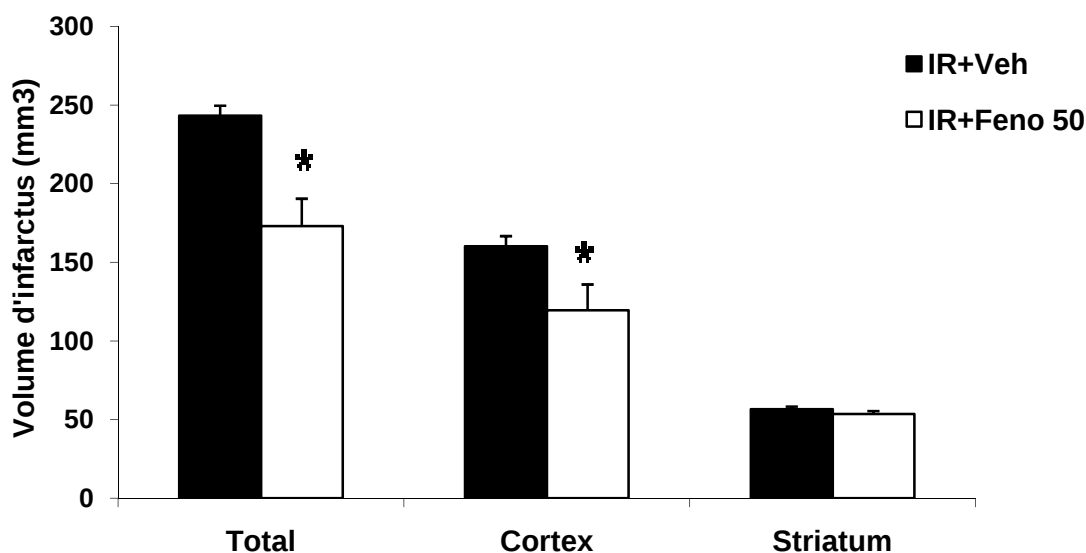
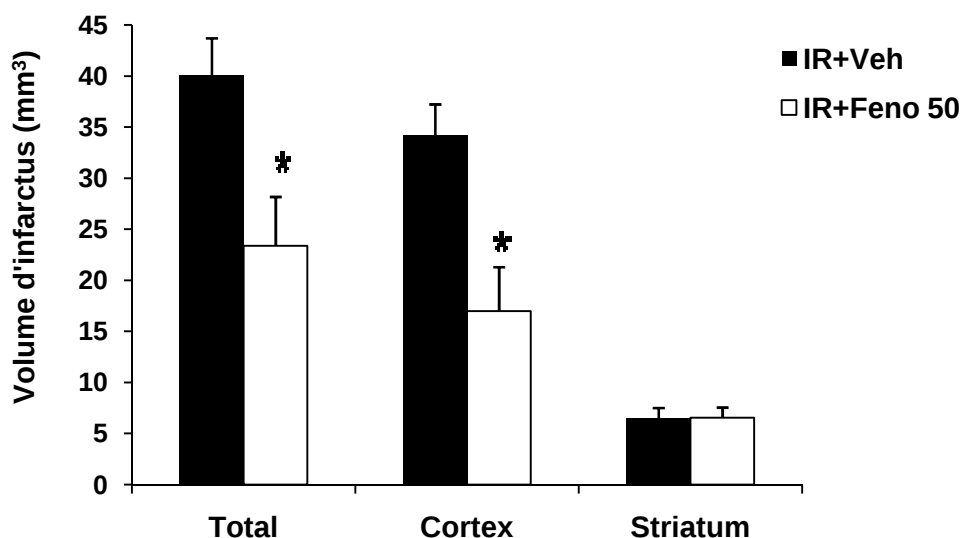


Figure 39 : Effet du fénofibrate en traitement aigu sur le volume d'infarctus chez le rat

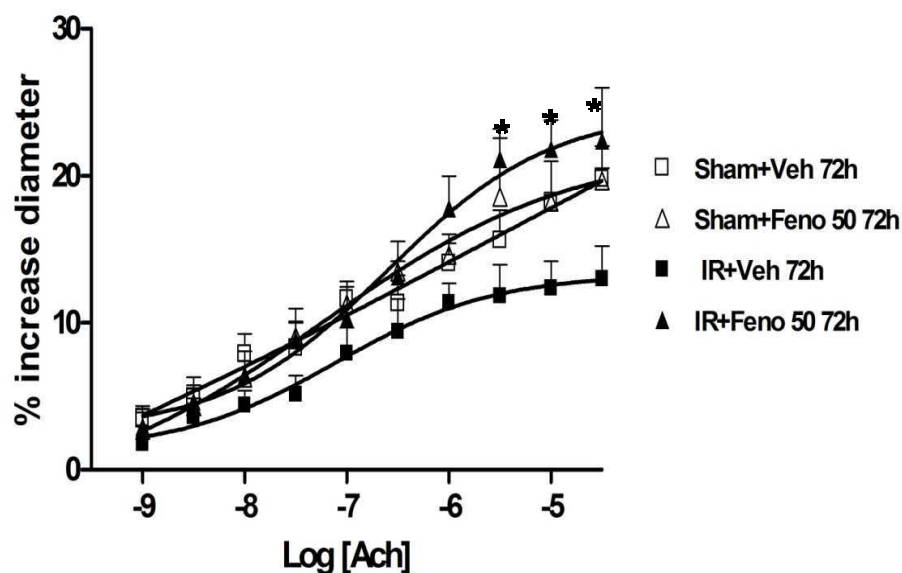
L'administration de fénofibrate (50 mg/kg/jour) en traitement aigu post-ischémique permet une diminution de 43 % du volume de l'infarctus cérébral total mesuré à 72 heures de reperfusion: $23,4 \pm 4,8 \text{ mm}^3$ contre $40,0 \pm 3,6 \text{ mm}^3$ pour le groupe I/R ($p < 0,01$). Cette diminution se fait exclusivement par une diminution de l'infarctus cérébral cortical : $17,0 \pm 4,3 \text{ mm}^3$ pour le groupe I/R+Féno contre $34,2 \pm 3,0 \text{ mm}^3$ pour le groupe I/R ($p < 0,01$) (figure 40).



*p<0.01 versus IR+Veh

Figure 40 : Effet du fénofibrate en traitement aigu sur le volume d'infarctus chez la souris

La relaxation endothélium-dépendante à l'acétylcholine était altérée chez les animaux ischémiés et traités par le véhicule (13.0 ± 2.2 %) en comparaison des animaux sham (22.2 ± 1.6 %, $p<0.05$). L'administration de fénofibrate à la dose de 50 mg/kg prévenait cette altération (22.4 ± 3.6 %) (figure 41).



*p<0.05 versus Sham+Veh

Figure 41 : Effet du fénofibrate en traitement aigu sur la relaxation endothélium-dépendante

La réactivité vasculaire était évaluée à 72 heures de reperfusion. Dans le groupe sham, la vasodilatation endothélium-dépendante induite par l'administration topique d'acétylcholine était responsable d'une augmentation du diamètre artériolaire par rapport au diamètre initial de $25.0 \pm 1.1\%$. Le fénofibrate dans le groupe sham+Féno n'entraînait pas de modification de la réponse vasculaire à l'acétylcholine. En revanche, l'ischémie-reperfusion altérait la vasoréactivité à l'acétylcholine avec une augmentation du diamètre vasculaire de $13.0 \pm 1.0\%$ ($p < 0,05$ versus sham). L'administration de fénofibrate pendant 72 heures permet de prévenir la dysfonction endothéliale post-ischémique, comme en témoigne l'augmentation du diamètre artériolaire induite par l'acétylcholine plus importante que chez les animaux ischémiés non traités. Cet effet reste partiel comme le montre l'existence d'une différence significative entre les groupes sham et I/R+Féno (figure 42).

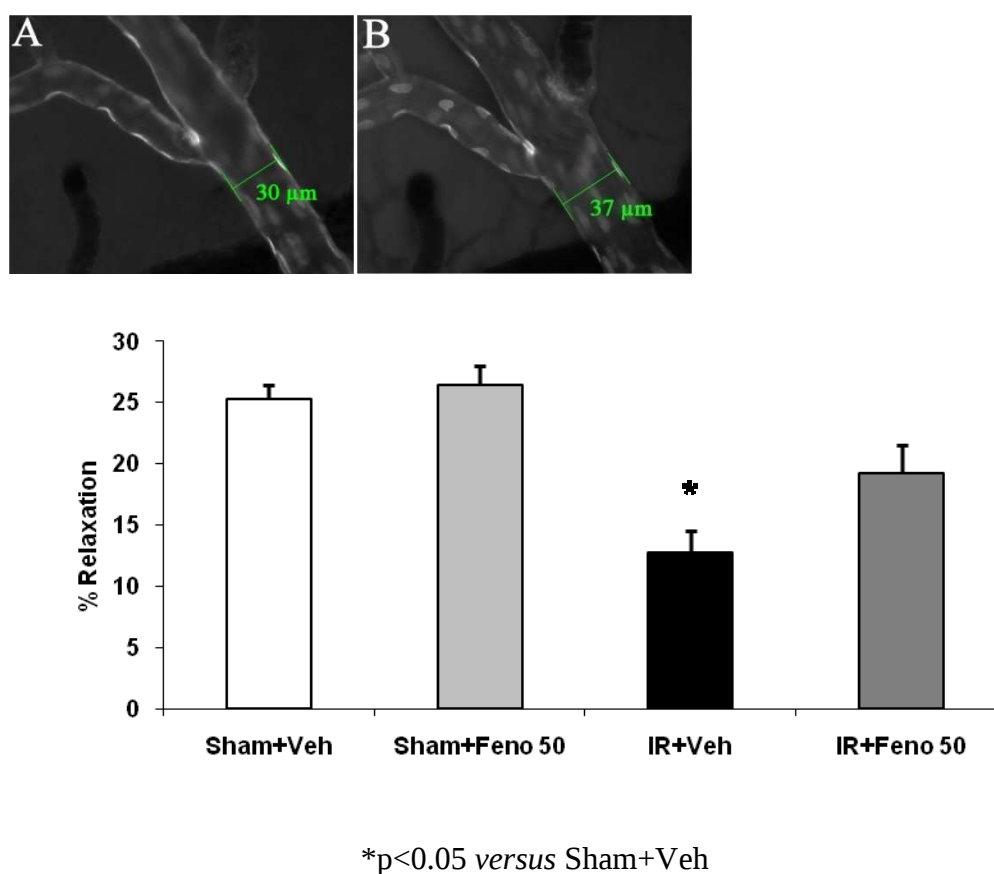
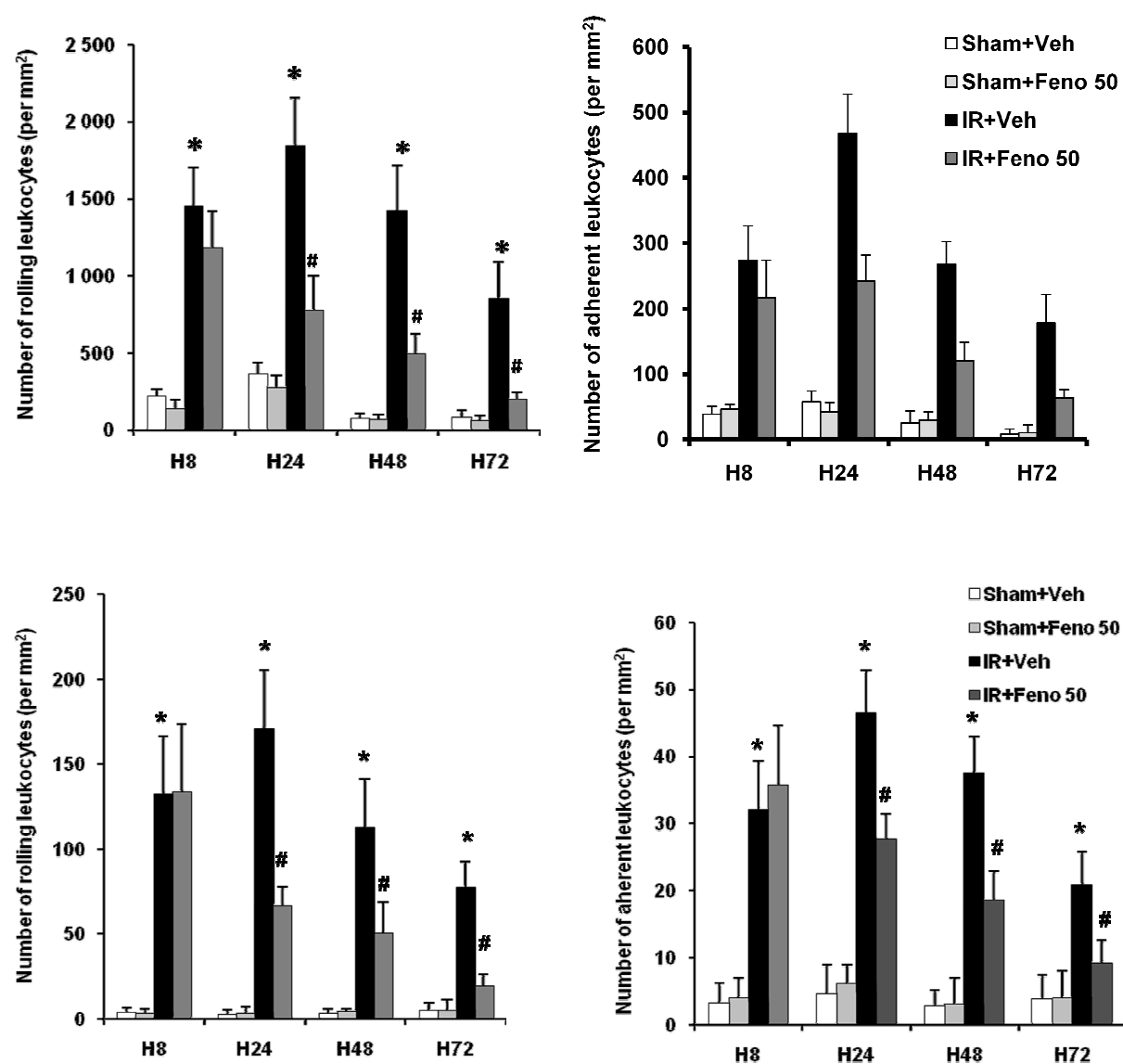
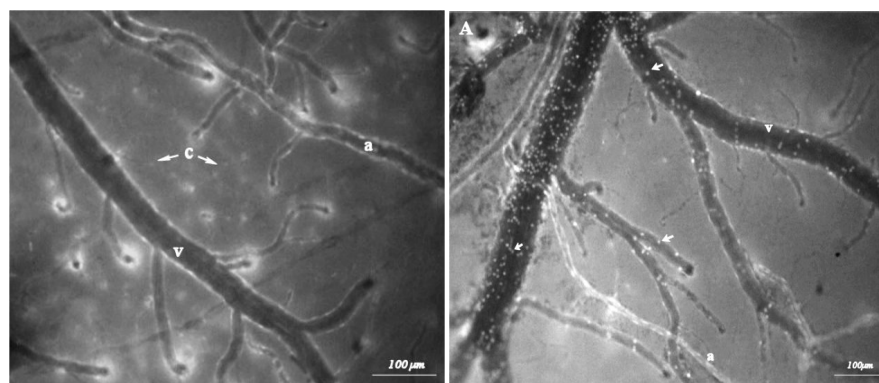


Figure 42 : Effet du fénofibrate en traitement aigu sur la relaxation endothélium-dépendante

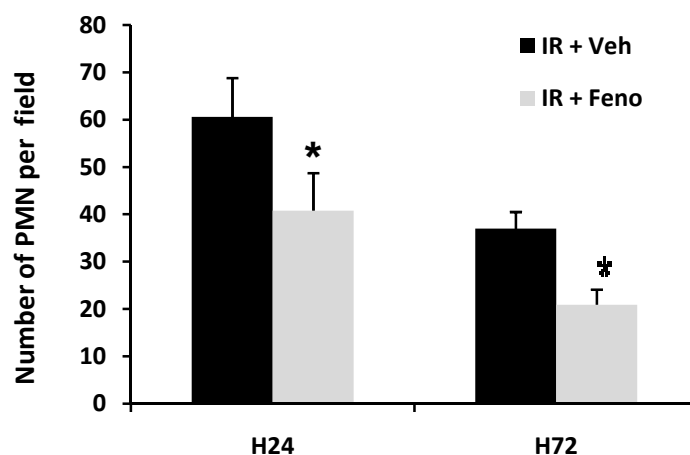
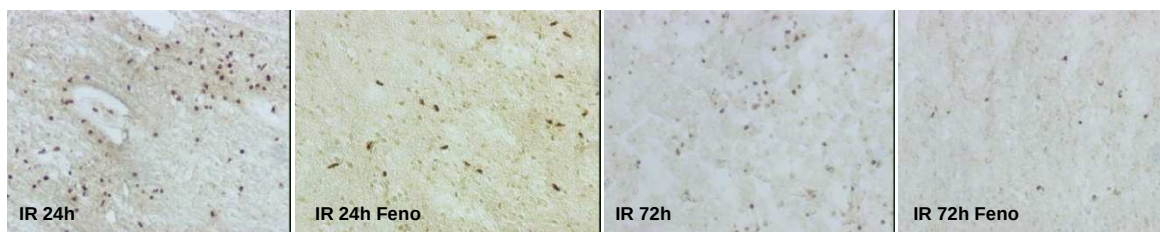
Le traitement par fénofibrate administré en post-ischémique diminuait nettement l'activation leucocytaire à partir de la 24^{ème} heure de reperfusion : le roulement et l'adhésion leucocytaires au niveau artériolaire et veinulaire étaient significativement diminués par l'administration du fénofibrate dans le groupe I/R+Féno à 24, 48 et 72 heures de reperfusion. En revanche, aucune différence entre les groupes I/R et I/R+Féno n'était retrouvée à 8 heures de reperfusion sur l'activation leucocytaire aux niveaux artériolaire et veinulaire (figure 43).



*p<0.01 versus Sham+Veh ; #p<0.01 versus IR+Veh

Figure 43 : Effet du fénofibrate sur le rolling et l'adhésion leucocytaire en traitement aigu

L'ischémie-reperfusion induisait une augmentation significative du nombre de polynucléaires neutrophiles dans le tissu ischémié chez les animaux traités par le véhicule. Cette infiltration était moindre après 72 heures de reperfusion. Un traitement par fénofibrate prévenait cette infiltration aussi bien à 24 heures qu'à 72 heures de reperfusion (figure 44).



*p<0.05 versus IR+Veh

Figure 44 : Effet du fénofibrate en traitement aigu sur l'expression de la MPO

L'expression d'ICAM-1 dans le tissu ischémié est induite par le processus d'ischémie-reperfusion. Cette surexpression par rapport aux animaux sham est maintenue après 72 heures de reperfusion. Le fénofibrate diminuait l'expression d'ICAM-1 à 24 et 72 heures de reperfusion (figure 45).

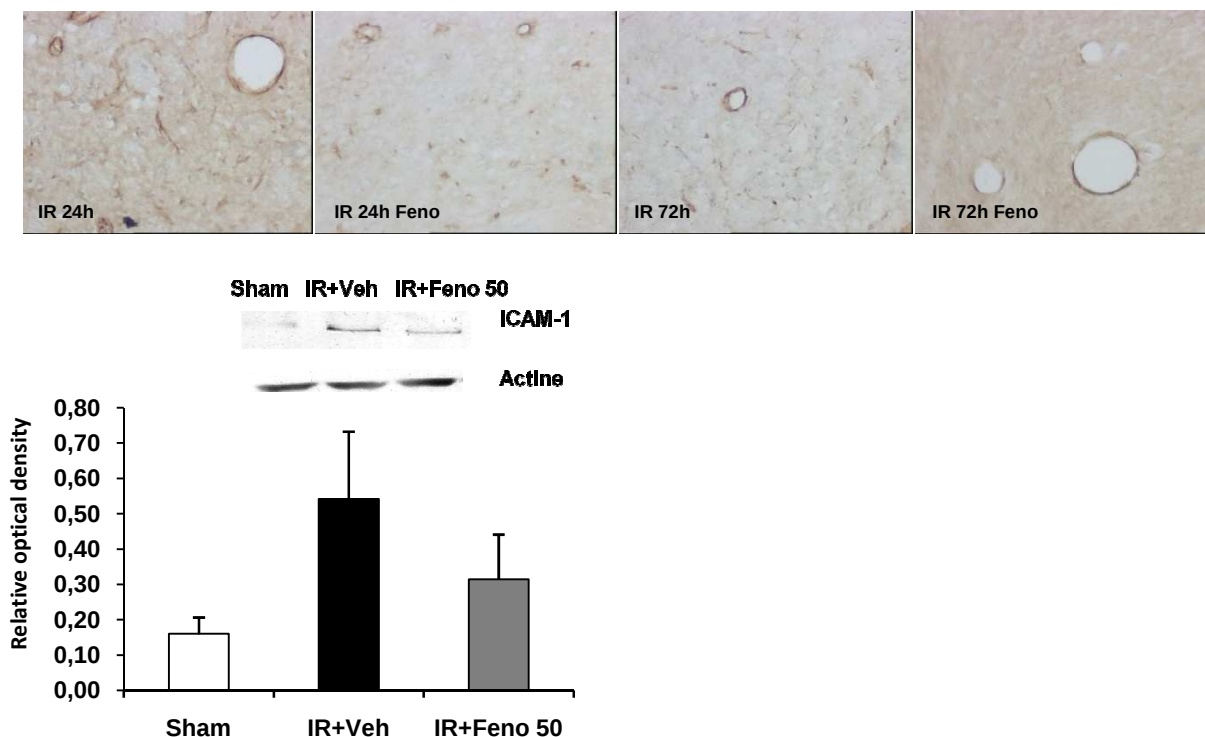
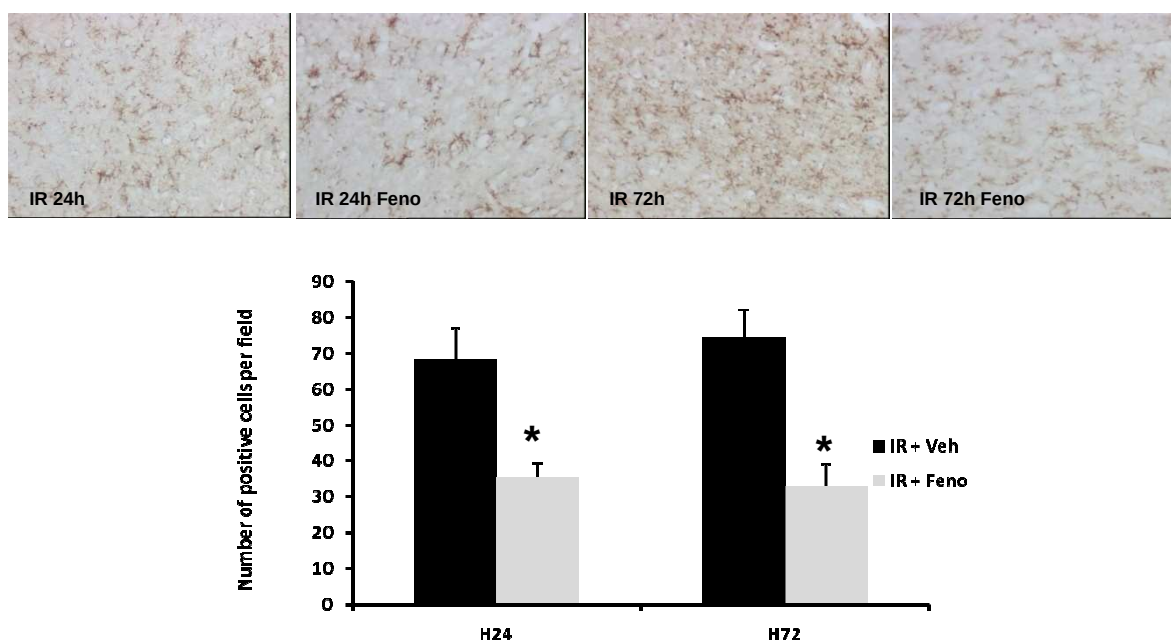


Figure 45 : Effet du fénofibrate en traitement aigu sur l'expression d'ICAM1

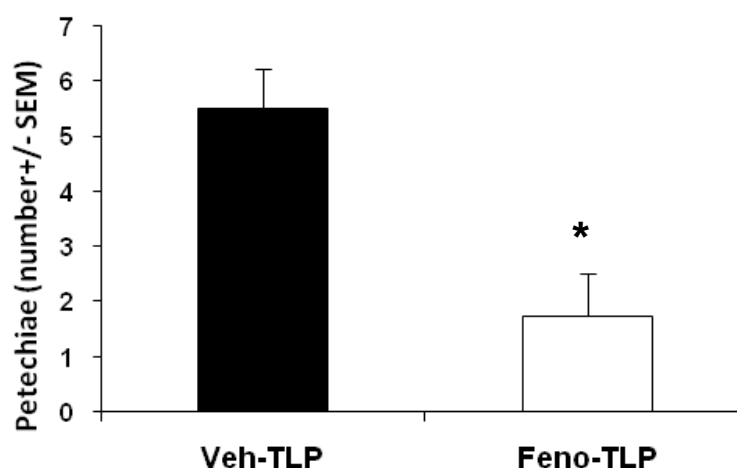
L'ischémie-reperfusion entraîne une augmentation de l'expression de la microglie activée après 24 heures de reperfusion persistant à 72 heures. Un traitement post-ischémique par fénofibrate prévenait cette activation microgliale à 24 et 72 heures de reperfusion (figure 46).



*p<0.05 versus IR+Veh

Figure 46 : Effet du fénofibrate en traitement aigu sur l'expression d'Ox42

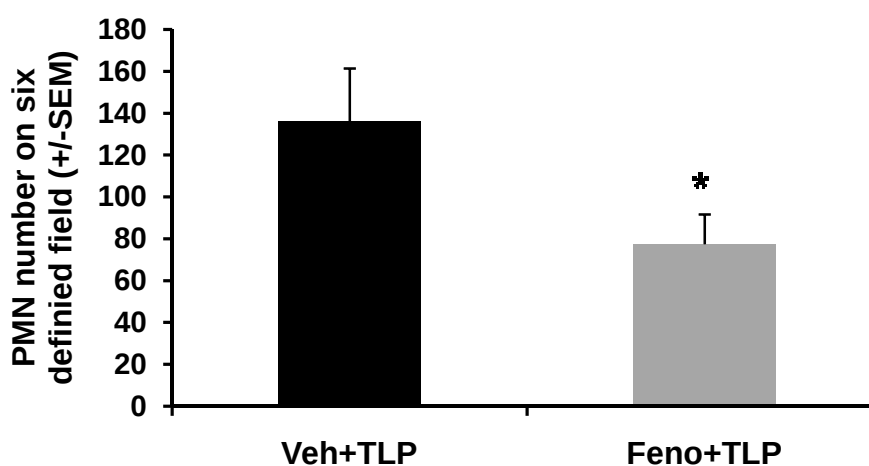
Le traitement des SHR par le fénofibrate administré pendant 3 jours après la réalisation de l'ischémie et la thrombolyse ne réduisait pas de manière significative l'incidence des complications hémorragiques : 33% dans le groupe Veh-TLP et 37.5% dans le groupe Feno-TLP. Chez les animaux où on a retrouvé des complications hémorragiques, on observait une différence significative dans leur sévérité entre le groupe Veh-TLP (5.5 ± 0.5 pétéchies) et le groupe Feno-TLP (1.7 ± 0.3 pétéchies, $p < 0.05$) (figure 47).



* $p < 0.05$ versus Veh+TLP

Figure 48 : Effet du fénofibrate en traitement aigu sur les complications hémorragiques

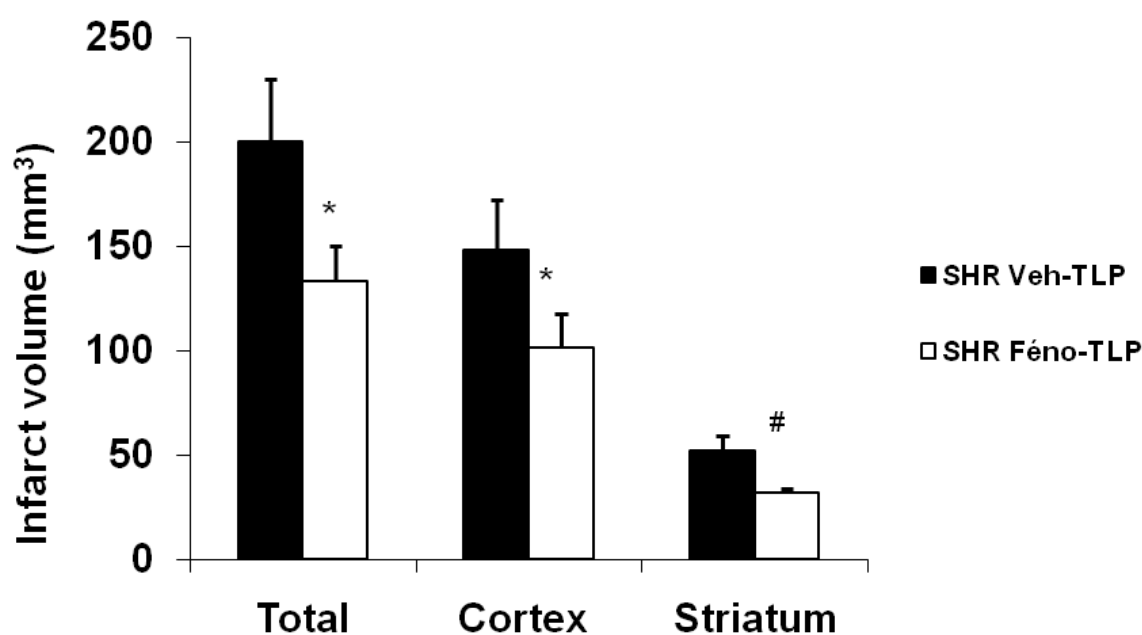
Enfin, l'administration de fénofibrate dans ce modèle diminuait de façon significative l'infiltration des polynucléaires dans la zone infarctée (68.5 ± 6.9 PMN chez les animaux traités par fénofibrate *versus* 136.2 ± 25.2 PMN chez les animaux traités par le véhicule, $p < 0.05$) (figure 48).



* $p < 0.05$ versus Veh+TLP

Figure 48 : Effet du fénofibrate sur l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le modèle de complications hémorragiques

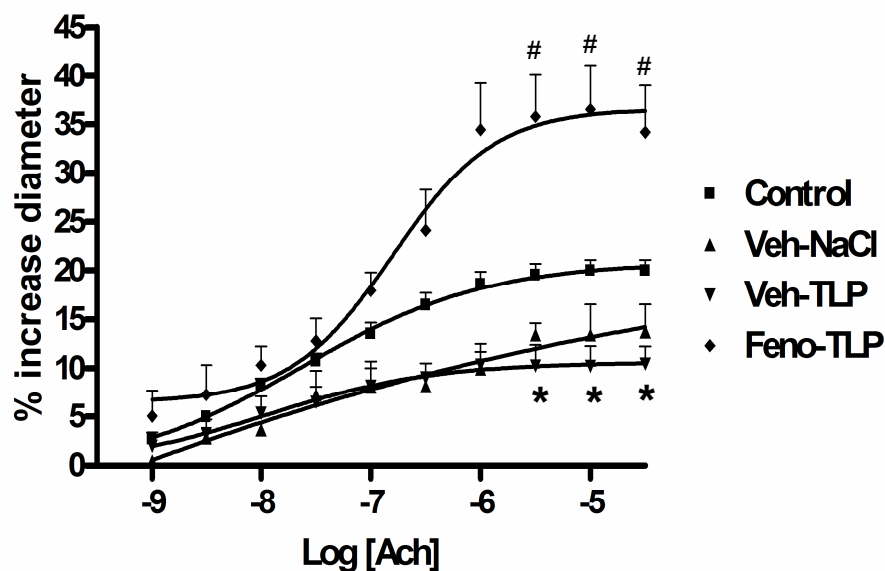
Chez les SHR recevant le fénofibrate pendant 3 jours après la réalisation de l'ischémie et recevant du TLP 6 heures après (groupe thrombolyse), le volume d'infarctus total (133.7 ± 12.4) était significativement diminué en comparaison de celui des rats non traités et perfusés par la solution de TLP ($200.6 \pm 29.8 \text{ mm}^3$, $p < 0.05$). Cette diminution était retrouvée au niveau cortical mais n'était pas significative ($148.3 \pm 24.1 \text{ mm}^3$ dans le groupe Veh-TLP *versus* $101.7 \pm 16.3 \text{ mm}^3$ dans le groupe Féno-TLP; $p = 0.055$). Cette protection était significative au niveau striatal ($32.0 \pm 1.9 \text{ mm}^3$ chez les SHR Féno-TLP *versus* $52.3 \pm 6.8 \text{ mm}^3$ chez les SHR Veh-TLP; $p < 0.01$) (figure 49).



* $p < 0.05$ *versus* Veh+TLP ; # $p < 0.01$ *versus* Veh+TLP

Figure 49 : Effet du fénofibrate en traitement aigu sur le volume d'infarctus dans le modèle de complications hémorragiques

La relaxation endothélium-dépendante est altérée chez les animaux traités par le véhicule et perfusés par la solution de TLP ($10.9 \pm 0.9 \%$, $p < 0.05$) par rapport aux animaux témoins. Un traitement par fénofibrate pendant 3 jours après la réalisation de l'ischémie prévenait cette altération chez les rats SHR ischémiés et recevant la solution de TLP (SHR TLP-Féno : $39.85 \pm 6.81 \%$, $p < 0.01$). Dans les groupes d'animaux traités par fénofibrate, le fénofibrate induisait une hyperrelaxation par rapport au groupe témoin (figure 50).

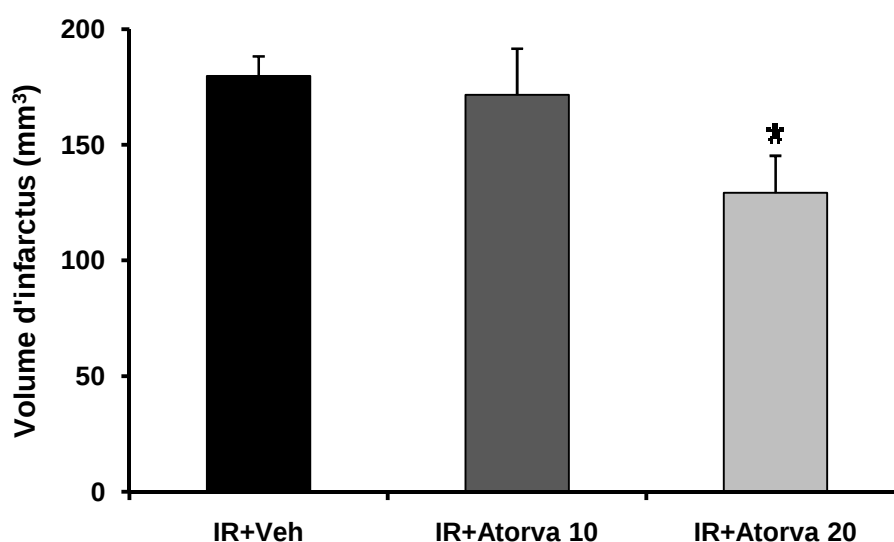


* $p < 0.05$ versus control ; # $p < 0.01$ versus control

Figure 50 : Effet du fénofibrate en traitement aigu sur la relaxation endothélium-dépendante dans le modèle de complications hémorragiques

II.B.3. Effets d'une modulation indirecte par l'atorvastatine

L'administration d'atorvastatine à la dose de 20 mg/kg/jour réduisait de manière significative le volume d'infarctus en comparaison des animaux traités par le véhicule ($129.2 \pm 7.1 \text{ mm}^3$ versus $179.7 \pm 8.6 \text{ mm}^3$, $p < 0.05$) (figure 51).



* $p < 0.05$ versus IR+Veh

Figure 51 : Effet de l'atorvastatine en traitement aigu sur le volume d'infarctus

L'administration post-ischémique d'atorvastatine à la dose de 20 mg/kg/jour tend vers une prévention de la dysfonction endothéliale (Figure 52).

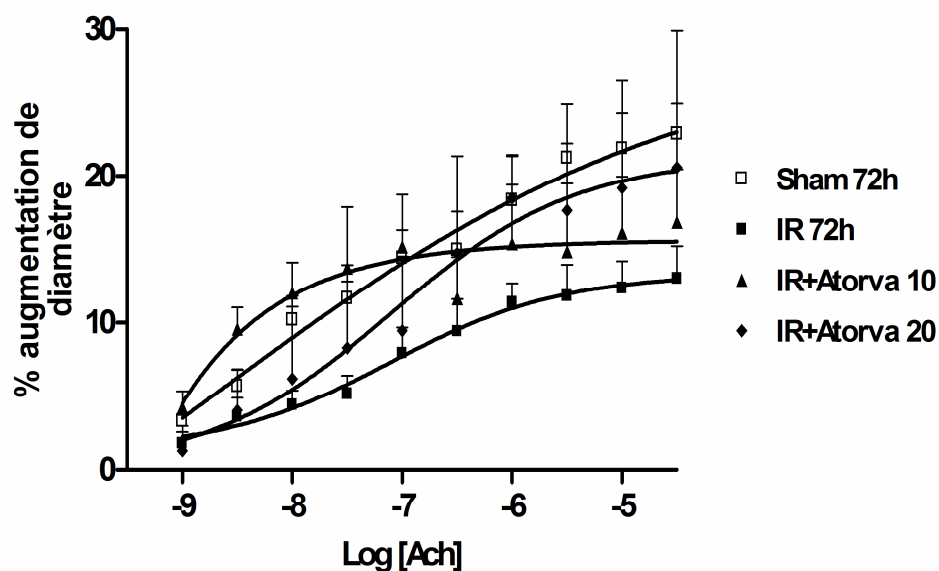


Figure 52 : Effet de l'atorvastatine en traitement aigu sur la relaxation endothélium-dépendante

L'infiltration des polynucléaires neutrophiles était prévenue par l'administration d'atorvastatine à la dose de 20mg/kg/jour (figure 53).

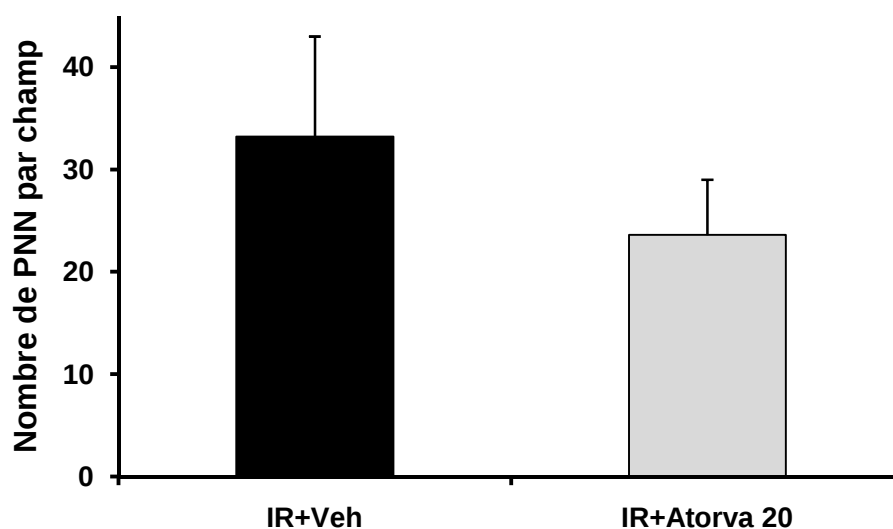


Figure 53 : Effet de l'atorvastatine en traitement aigu sur l'infiltration des polynucléaires neutrophiles

Article n°1

Pharmacological neutropenia prevents endothelial dysfunction but not smooth muscle functions impairment induced by middle cerebral artery occlusion

Olivier Pétrault, Thavarak Ouk, Sophie Gautier, Maud Laprais, Patrick Gelé, Michèle Bastide, Régis Bordet

British Journal of Pharmacology 2005 ; 144 : 1051-58

Pharmacological neutropenia prevents endothelial dysfunction but not smooth muscle functions impairment induced by middle cerebral artery occlusion

¹Olivier Pétrault, ¹Thavarak Ouk, ¹Sophie Gautier, ¹Maud Laprais, ¹Patrick Gelé,
^{1,2}Michèle Bastide & ^{*}¹Régis Bordet

¹EA 1046-Laboratoire de Pharmacologie, Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Université de Lille 2 et Centre Hospitalier Universitaire de Lille, 1 place de Verdun 59045, Lille Cedex, France and
²IUT A, Université Sciences et Techniques de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

1 The polymorphonuclear neutrophils (PMN) activation and mobilization observed in acute cerebral infarction contribute to the brain tissue damage, but PMN could also be involved in postischemic functional injury of ischemied blood vessel.

2 This study was undertaken to investigate whether pharmacological neutropenia could modify the postischemic endothelial dysfunction in comparison to smooth muscle whose impairment is likely more related to reperfusion and oxidative stress.

3 A cerebral ischemia–reperfusion by endoluminal occlusion of right middle cerebral artery (MCA) was performed 4 days after intravenous administration of vinblastine or 12 h after RP-3 anti-rat neutrophils monoclonal antibody (mAb RP-3) injection into the peritoneal cavity, on male Wistar rats with 1-h ischemia then followed by 24-h reperfusion period. Brain infarct volume was measured by histomorphometric analysis and vascular endothelial and smooth muscle reactivity of MCA was analysed using Halpern myograph.

4 Neutropenia induced a neuroprotective effect as demonstrated by a significant decrease of brain infarct size. In parallel to neuroprotection, neutropenia prevented postischemic impairment of endothelium-dependent relaxing response to acetylcholine. In contrast, smooth muscle functional alterations were not prevented by neutropenia. Ischemia–reperfusion-induced myogenic tone impairment remained unchanged in vinblastine and mAb RP-3-treated rats. Postischemic Kir2.x-dependent relaxation impairment was not prevented in neutropenic conditions. The fully relaxation of smooth muscle response to sodium nitroprusside was similar in all groups.

5 Our results evidenced the dissociate prevention of pharmacologically induced neutropenia on postischemic vascular endothelial and smooth muscle impairment. The selective endothelial protection by neutropenia is parallel to a neuroprotective effect suggesting a possible relationship between the two phenomena.

British Journal of Pharmacology (2005) **144**, 1051–1058. doi:10.1038/sj.bjp.0706124

Published online 7 February 2005

Keywords: Cerebral ischemia; polymorphonuclear neutrophils; endothelium; smooth muscle; potassium channels

Abbreviations: ACh, acetylcholine; 5-HT, serotonin (5-hydroxytryptamine); ICAM, intercellular cell adhesion molecules; I/R, ischemia/reperfusion; Kir, inward rectifier potassium channel; mAb RP-3, anti-rat neutrophils monoclonal antibody; MABP, mean arterial blood pressure; MCA, middle cerebral artery; MMP, matrix metalloproteinase; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; ONOO[−], peroxynitrite; PMN, polymorphonuclear neutrophil; ROS, reactive oxygen species; SNP, sodium nitroprusside; TMP, transmural pressure; Vb, vinblastine; Veh, vehicle

Introduction

After focal cerebral ischemia, the function of cerebral arteries is critical to maintain cerebral perfusion and preserve neuronal integrity. The duration and level of the blood flow deficit are associated with the severity of brain damage. Two different regions can be distinguished: the core where neurons are definitively death; the penumbra that can progress to infarction if maintenance of a partial blood supply is not sufficient. The level of cerebral blood flow in penumbra is partly dependent of vascular functions, which are impaired in course

of ischemia and reperfusion. The protection of vascular bed during ischemia/reperfusion (I/R) represents a potent pharmacological target to limit infarct extent, explaining the necessity to understand the physiopathology of I/R-induced functional alterations of blood vessel. Several studies reported impairments of many functional vascular bed including endothelium relaxing response (Cipolla *et al.*, 1997), myogenic activity (Cipolla & Curry, 2002) and smooth muscle relaxation consecutive to inward rectifier potassium channels (Kir2.x) activation (Marrelli *et al.*, 1998; Bastide *et al.*, 1999). Ischemia and reperfusion affect differently endothelium and smooth muscle functions suggesting that several mechanisms could be

*Author for correspondence; E-mail: bordet@univ-lille2.fr
published online 7 February 2005

involved in the different compartments. Indeed, ischemia alone induces an alteration of endothelial relaxing response, which is worsen by reperfusion, while reperfusion is necessary to induce smooth muscle functional abnormalities in the absence of effect induced by ischemia alone (Cipolla *et al.*, 1997; Pétrault *et al.*, 2004).

It is now established that maintenance of a partial or complete blood flow is essential to preserve cerebral tissue whereas reperfusion paradoxically induces excessive generation of reactive oxygen species (ROS) known to impair cell membranes (lipid peroxidation and protein oxidation), ion channels and electrical properties of vascular smooth muscle (Kourie, 1998). Reperfusion-induced ROS contribute to a decrease of the NO availability responsible for the post-ischemic endothelial dysfunction (Drexler, 1999; Cai & Harrison, 2000). This decrease of NO bioavailability is not explained by NO synthase (NOS) alteration, since endothelial NOS expression increased in the course of cerebral ischemia (Leker *et al.*, 2001). Numerous reports have shown that oxidative stress modulation early in the course of reperfusion could reduce cerebrovascular oxidative damages. We have previously demonstrated that pharmacological modulation of oxidative stress prevents postischemic Kir2.x impairment (Bastide *et al.*, 2003; Pétrault *et al.*, 2004). In contrast, the oxidative stress modulation during the reperfusion by an antioxidant agent did not prevent the endothelial dysfunction (Pétrault *et al.*, 2004), suggesting the involvement of other mechanisms.

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) activation are involved in vascular reactivity modulation in different pathological circumstances. The prevention of PMN adhesion contributes to the protective effect of preconditioning against cardiac ischemia and reperfusion-induced endothelial injury (Beauchamp *et al.*, 1999; Laude *et al.*, 2002). PMN activation by injection of phorbol ester impaired the endothelium-dependent relaxing response to acetylcholine (Akopov *et al.*, 1994). In subarachnoid hemorrhage model, vascular dysfunction-induced cerebral vasospasm has been related to inflammatory cytokine cascade released by leukocytes and could be improved by endothelial NOS increase (Mori *et al.*, 2001; Takizawa *et al.*, 2001; McGirt *et al.*, 2002). Involvement of PMN in functional vascular injury occurring in course of cerebral ischemia has not been yet investigated but is suspected in regard to their role in cerebral ischemia physiopathology.

The leukocytes involvement in physiopathology of I/R has been previously demonstrated using induction of neutropenia by vinblastine and participated to infarction and oxidative stress in the cortex but not in the striatum (Beray-Berthet *et al.*, 2003). In addition, PMN accumulation in acute cerebral infarction was correlated with brain tissue damage (Akopov *et al.*, 1996a,b). Neutrophils have the capacity to generate ROS like superoxide anion, hydroxyl radical, protagonists known to be deleterious in the course of ischemia and reperfusion phenomena (Matsuo *et al.*, 1995; Love, 1999). Owing to its chemical interaction with superoxide anion and its transformation in the highly harmful peroxynitrite (ONOO⁻), indirect oxidative stress decreases the bioavailability of NO (Forman *et al.*, 1998). On the other hand, several studies have suggested that PMN involvement in matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) proform releasing and the blood-barrier breakdown, participated to aggravate infarction by their consecutive

hemorrhage complications (Gautier *et al.*, 2003; Justicia *et al.*, 2003).

All these data suggest that I/R-induced PMN activation could contribute to the mechanisms of vascular bed reactivity impairment in particular endothelium dysfunction. To test this hypothesis, we investigated, in the present study, whether in pharmacologically induced neutropenia conditions the post-ischemic endothelial dysfunction is modified in comparison to smooth muscle, whose impairment is more related to reperfusion and oxidative stress.

Methods

All experiments were performed in strict accordance with the guidelines of the National Institutes of Health and French Department of Agriculture, on male Wistar rats (IFFA Credo, France) weighing 280–320 g according to rat middle cerebral artery (MCA) occlusion model.

Animals and drugs administration

MCA occlusion or sham surgery was consequently performed 4 days after intravenous administration of vinblastine (0.5 mg kg⁻¹) or vehicle (saline 0.9%) to male Wistar rats. Two injections of anti-rat neutrophils monoclonal antibodies (mAb RP-3; Sekiya *et al.*, 1989) in peritoneal cavity were carried out 12 h before MCA occlusion (1 ml mAb RP-3 diluted solution) and during the surgery (2 ml mAb RP-3 diluted solution). The numbers of white blood cells were counted, and hemograms of 100 white blood cells were examined by Giemsa staining (Hemoquick). Four groups of rats have been defined: (i) sham-operated rats (Sham); (ii) vehicle-treated ischemic/reperfused (Veh + I/R); (iii) vinblastine-treated I/R (Vb + I/R); (iv) mAb RP-3-injected rats (mAb RP-3 + I/R).

MCA occlusion model

Anesthesia was induced by chloral hydrate administered i.p. at a dose of 300 mg kg⁻¹. A rectal probe was inserted and body temperature maintained by the use of a heating lamp at 37 ± 0.5°C. The caudal artery was exposed and cannulated with a 24G polyethylene catheter and connected to a blood pressure monitor. Mean arterial blood pressure (MABP, mmHg) was monitored throughout the experiment and blood samples were taken before, during and after ischemia to measure blood pH, arterial PaO₂ (mmHg) and arterial PaCO₂ (mmHg).

The ostium of the right MCA was occluded intraluminally as previously described (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. The pterygopalatine artery was exposed by developing a plane alongside the internal carotid artery, and was ligated at its origin with a fine silk. Aneurysm clip was placed across internal carotid artery and an arteriotomy was made in the common carotid artery stump allowing the introduction of a 4/0 monofilament nylon suture 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. After 60 min, the suture 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 in cage to recover from anesthesia at room temperature and were allowed to eat and drink freely. The sham operation occurs with the same manipulation without introduction of the monofilament.

Infarct volume measurement

At 24 h after reperfusion the rats were killed with an overdose of pentobarbital (200 mg kg⁻¹) injected i.p. and brains were rapidly removed in an ice-cold saline solution gassed with 5% CO₂ and 95% O₂. MCAs were carefully dissected to the vascular smooth muscle cells preparation or for vasoreactivity analysis and thereafter brains were frozen and coronally dissected into 50- μ m-thick slices on a cryostat at 12 levels separated by 1-mm intervals, according to stereotaxic sections maps (Paxinos & Watson, 1986). Sections were stained by cresyl fast violet. The unstained area of the brain was defined as infarcted. Cortical and subcortical infarcted areas and total hemispheric areas were calculated separately for each coronal slice by an image analysis software (Color Image 1.32, NIMH, Bethesda, MD, U.S.A.) after digitization by scanner process. Total infarct volumes as well as hemispheric volumes (in mm³) were calculated by the use of numerical integration of the respective areas for all the sections per animals and the distance between them. A corrected total infarct volume was calculated to compensate for the effect of brain edema (Lin *et al.*, 1993). The corrected volume was calculated using the following equation: corrected infarct volume = total infarct volume $\times$ (left hemisphere volume/right hemisphere volume).

Preparation of arterial segment and pressurized arteriograph system

Segment of dissected right MCA was mounted in a small vessel arteriograph (Living Systems Instrumentation, Burlington, VT, U.S.A.) on two glass cannulas perfused with saline solution. The artery was secured on the proximal and distal cannulas with nylon ties. The distal cannula was closed in order to work in no flow condition. The arteriograph chamber was continuously supplied with saline solution equilibrated with 5% CO₂/95% O₂ and maintained at 37°C and pH 7.4. The proximal cannula was connected to a pressure transducer, a miniature peristaltic pump and a servo controller that continually measured and adjusted transmural pressure (TMP). The entire arteriograph system was positioned on the stage of an inverted microscope equipped with a video camera and a monitor. The lumen diameter was measured by image analysis with a video dimension analyser. The output of the video dimension, which is proportional to diameter, was continually sent to a digital tape recorder (DTR-1205).

Experimental protocol

All mounted and pressurized arteries were equilibrated at a TMP of 25 mmHg for 1 h to stabilize before experiments were

conducted. The spontaneous contracting response of cerebral arteries to pressure contributes to autoregulation of cerebral blood flow and characterises the myogenic tone. To evaluate myogenic reactivity, the TMP was increased step by step in increments of 25 mmHg from 25 to 100 mmHg and arterial diameter was recorded at each TMP once stable (5 min). At the end of each experiment and after another 25 mmHg TMP equilibration, TMP was once again increased by 25 mmHg increment steps from 25 to 100 mmHg in addition with papaverine (10 μ M), a phosphodiesterase inhibitor, to record passive fully relaxed diameter. Then, the TMP was adjusted at 75 mmHg for the remainder of the experiment. Acetylcholine (ACh) relaxing dose-response was determined by cumulative addition of ACh (0.001–30 μ M) on MCA beforehand constricted by serotonin (1 μ M-induced 90% of the maximum constriction). After washout with fresh saline solution allowing the return to basal diameter, a 15 mM KCl-containing saline solution was superfused to the vessel and induced a smooth-muscle dependent vasodilation, which is carried by activation of Kir2.x channels, most probably Kir2.1 (Bradley *et al.*, 1999), and inhibited by administration of BaCl₂ (75 μ M) a Kir2.x blocker. To test the NO-mediated smooth muscle relaxation, a single concentration of sodium nitroprusside (SNP 10 μ M) was added in the bath after precontraction with 5-HT (1 μ M).

Drugs and solutions

The ionic composition of the physiologic saline solution used for all vasoreactivity experiments was as follows (mM): 119 NaCl, 24 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.17 MgSO₄·7H₂O, 10 glucose, 1.6 CaCl₂, pH 7.4. All vasoactive drugs (ACh, 5-HT, SNP and KCl) were purchased from Sigma Chemical Co. ACh, 5-HT and SNP were made fresh daily as stock solutions of 0.1 M and stored at 4°C for all experimental time. RP-3 anti-rat neutrophils monoclonal antibodies were supplied from BD Pharmingen, and vinblastine from Laboratoire EuroGenerics.

Data calculation and statistical analysis

Spontaneous arterial tone was evaluated as a percent of decrease in diameter from the fully relaxed diameter in papaverine and was plotted at each TMP. The relaxing responses to ACh and SNP were respectively expressed as the percent of increase of the luminal diameter and the percent of relaxation related to basal tone after precontraction. The 15 mM KCl-induced vasorelaxation is estimated as the % of increase of the basal tone diameter.

All values were expressed as mean $\pm$ s.e. Continuous variables (infarct volumes, myogenic tone, MCA diameter changes) were compared with a one-way ANOVA in four treatment groups followed, when ANOVA was significant, by a *post hoc* protected least significant difference (PLSD) Fisher test. A value of $P < 0.05$ was considered as significant.

Results

Effect of vinblastine and RP-3 anti-rat neutrophils antibody on leukocytes

Ischemia followed by reperfusion (Veh + I/R) induced a significant ($P < 0.05$) increase of PMN number in comparison

Table 1 Variation percent of neutrophil blood counts (PMN), red blood cells (RBC) and white blood cells (WBC) numbers from rats treated by administration of vehicle (saline 0.9%), vinblastine (0.5 mg kg⁻¹) or RP-3 anti-rat neutrophils antibody (mAb RP-3) in middle cerebral artery occlusion conditions (I/R) or not (Sham)

	Sham Vehicle (n = 4)	Vehicle (n = 8)	Ischemia/reperfusion (I/R) Vinblastine (n = 8)	mAb RP-3 (n = 4)
PMN (% variation)	—	+ 50.1%	-99.8%	-39.1%
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	10.3 $\pm$ 1.0	10.2 $\pm$ 0.6	7.2 $\pm$ 0.5	9.5 $\pm$ 1.2
WBC (/mm ³)	4533 $\pm$ 677	4380 $\pm$ 540	700 $\pm$ 220	4605 $\pm$ 530

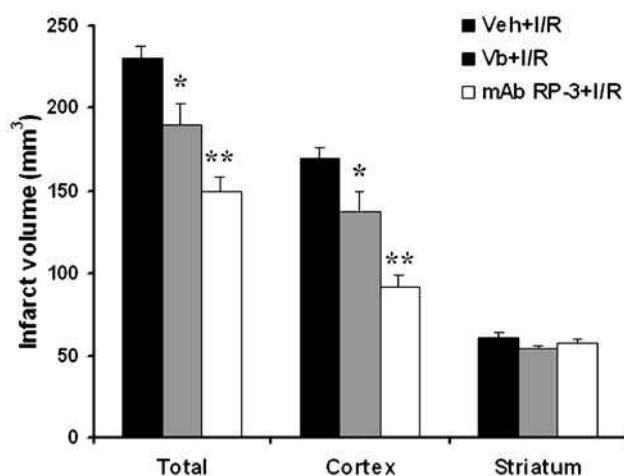


Figure 1 Effect of administration (i.v.) of vehicle (Veh: saline 0.9%, $n = 10$) or vinblastine (Vb: 0.5 mg kg⁻¹, $n = 10$) and injections (i.p.) of RP-3 anti-rat neutrophils antibody (mAb RP-3, $n = 4$) on total, cortical and striatal infarct volume (corrected for edema) induced by 1 h focal cerebral ischemia and followed by 24 h reperfusion period. Values are mean $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$ as compared with vehicle-treated animals.

to sham-operated animals (Sham) as shown in Table 1. After I/R, treatment by vinblastine and mAb RP-3 reduced in a significant manner ($P < 0.05$) the number of PMN. Vinblastine administration decreased all white blood cells number to 80% while mAb RP-3 had a specific action on PMN (Table 1).

Effect of neutropenia on cerebral infarct volume

In rats treated with vinblastine 4 days before I/R at the dose of 0.5 mg kg⁻¹, there was a significant ($P < 0.05$) decrease in total infarct volume with edema correction (190.5 $\pm$ 12.5 mm³) as compared to infarct volume in vehicle-treated animals (231.1 $\pm$ 7.2 mm³). Administration of mAb RP-3 reduced brain infarct volume (149.7 $\pm$ 8.6 mm³). These neuroprotective effects of vinblastine and mAb RP-3-induced neutropenia were significant ($P < 0.05$) in the cortical part of infarcted area (Veh + I/R: 169.9 $\pm$ 6.8 mm³, Vb + I/R: 136.5 $\pm$ 13.6 mm³ and mAb RP-3 + I/R: 92.0 $\pm$ 7.5 mm³) but not in striatal part as shown in Figure 1.

Effect of neutropenia on myogenic activity

As shown in Figure 2, ischemia and reperfusion induced a significant loss of pressure-induced contracting response of MCA (Veh + I/R) as compared to sham-operated MCA

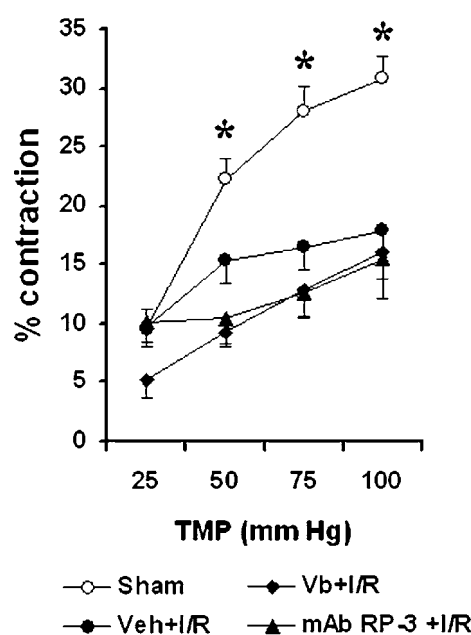


Figure 2 Effect of administration (i.v.) of vehicle (saline 0.9%) or vinblastine (0.5 mg kg⁻¹) and RP-3 anti-rat neutrophils antibody (mAb RP-3) on response of middle cerebral arteries (MCA) to pressure. Basal tone present in each MCA at different transmural pressures (TMP) was evaluated as a percent of spontaneous decrease in diameter from the fully relaxed diameter in response to papaverine (10 μ M). MCA were originated from sham-operated animals (Sham), or ischemia (1 h) following by reperfusion (24 h)-operated rats (I/R). Values are mean $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$ as compared to I/R groups.

(Sham) with respectively 15.8 $\pm$ 2.5 versus 28.1 $\pm$ 1.9% decrease of diameter. Vinblastine- and mAb RP-3-induced neutropenia did not correct the lost of MCA contractility in the course of I/R as illustrated in Figure 2 (Vb + I/R: 16.5 $\pm$ 1.9% and mAb RP-3 + I/R: 12.6 $\pm$ 2.1%).

Effect of neutropenia on 15 mM KCl-induced smooth muscle relaxation

Smooth muscle cell-dependent relaxation of MCA was evaluated by application of 15 mM KCl in the different groups of rats. In Veh + I/R animals, the relaxation of the occluded MCA (4.6 $\pm$ 1.4%) was significantly reduced in comparison to sham rats (26.0 $\pm$ 2.4%) and was not influenced by vinblastine treatment (Vb + I/R: 8.5 $\pm$ 3.5%) and mAb RP-3 administrations (mAb RP-3 + I/R: 7.7 $\pm$ 1.2%; Figure 3).

Effect of neutropenia on endothelium reactivity

No difference in 5-HT-induced maximum contracting response was observed between the four groups (Table 2). The ACh-induced endothelium-dependent relaxing response was impaired in vehicle-treated ischemic animals (Veh+I/R) as proven by decrease in maximal relaxation ($12.1 \pm 2.8\%$) in comparison to sham-operated group ($24.9 \pm 3.0\%$; $P < 0.05$). This impairment was prevented in vinblastine-treated animals, as shown by the lack of significant difference between Vb+I/R versus Sham and by the significant difference between Vb+I/R versus Veh+I/R (Figure 4, Table 2). Administrations of RP-3 anti-rat neutrophils monoclonal antibodies prevented endothelial dysfunction as illustrated by dose-response curve in Figure 4 and the significant difference between the maximal relaxing response of mAb RP-3+I/R MCAs as compared to Veh+I/R MCAs (Table 2). Endothelium-independent relaxing responses to SNP ($10 \mu\text{M}$) were similar in all four groups (Table 2).

Discussion

In the present study, we demonstrated that the postischemic endothelial dysfunction was totally prevented by pharmacologically induced neutropenia in I/R conditions. In contrast, smooth muscle compartment alterations were not influenced

by pharmacological neutropenia as proved by the persistence of impairment of myogenic tone and Kir2.x activation-induced relaxation. Ischemia and reperfusion induced an increase of PMN number. Vinblastine treatment drastically reduced number of neutrophils and white blood cells while mAb RP-3 treatment specifically diminished PMN. The beneficial effects on endothelial function are parallel to a protective effect against brain infarct, as demonstrated by a significant decrease in infarct size, in particular in the cortical part of ischemia.

Our data concerning neutropenia-induced decrease of infarct size are in accordance with previous studies showing that pharmacologically-induced neutropenia is responsible for a neuroprotection. This neuroprotective effect points out the potential role of infiltration of infarct area by PMN. This deleterious role has been demonstrated in most studies, whereas it remains controversial because of the lack of infiltration in some studies (Hayward *et al.*, 1996; Bera-

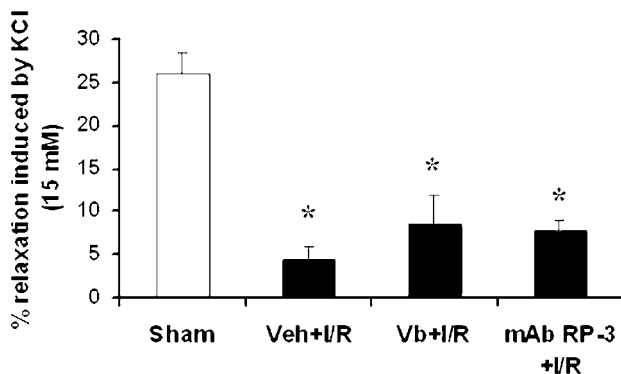


Figure 3 Percent change in diameter in response to 15 mM KCl of middle cerebral arteries originated from sham-operated animals (Sham), or ischemia (1 h) following by reperfusion (24 h)-operated rats (I/R) treated by vinblastine (Vb: 0.5 mg kg^{-1}) or not (Veh: saline vehicle 0.9%) and RP-3 anti-rat neutrophils antibody (mAb RP-3). Values are mean $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$ as compared to Sham.

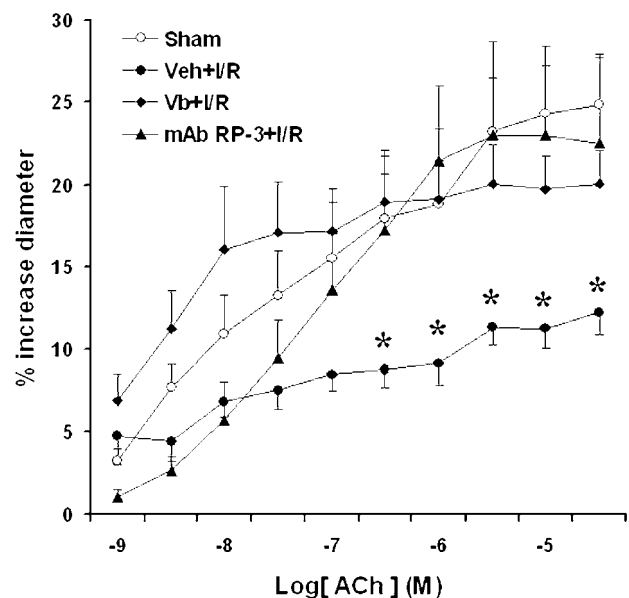


Figure 4 Dose-response curves to ACh for vehicle (saline 0.9%), vinblastine (0.5 mg kg^{-1}) or RP-3 anti-rat neutrophils antibody (mAb RP-3) treated animals in ischemia/reperfusion (I/R) or sham operations. Relaxation was expressed as the percent change in diameter of 5-HT ($1 \mu\text{M}$) precontracted middle cerebral artery in response to cumulative concentration of ACh (0.001 – $30 \mu\text{M}$). Values are mean $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$ as compared to Sham.

Table 2 Acetylcholine (ACh), potassium chloride (KCl), serotonin (5-HT) and sodium nitroprusside (SNP) vasoreactive effects on middle cerebral artery (MCA)

	Sham Vehicle (n = 7)	Vehicle (n = 7)	Ischemia/reperfusion (I/R) Vinblastine (n = 8)	mAb RP-3 (n = 4)
ACh $10 \mu\text{M}$ (% relaxation)	24.3 ± 2.9	$11.3 \pm 1.2^*$	$19.8 \pm 2.0^{\#}$	$23.0 \pm 5.4^{\#}$
KCl 15 mM (% relaxation)	26.0 ± 2.4	$4.6 \pm 1.3^*$	$6.1 \pm 2.9^*$	$7.0 \pm 1.1^*$
SNP $10 \mu\text{M}$ (% relaxation)	58.4 ± 5.2	52.5 ± 4.9	50.4 ± 6.0	55.7 ± 12.0
5-HT $1 \mu\text{M}$ (% constriction)	29.6 ± 2.0	29.8 ± 2.0	27.5 ± 4.5	33.3 ± 5.6

MCA were dissected from rats in sham-operated conditions (Sham) or after 1 h ischemia followed by 24 h reperfusion period (I/R) and treated by vehicle (Veh), vinblastine or RP-3 anti-rat neutrophils monoclonal antibody (mAb RP-3). Values are mean $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$ as compared to Sham, $^{\#}P < 0.05$ as comparison to vehicle-treated I/R group.

Berthat *et al.*, 2003) or because of the lack of relationship between infarct severity and time course of this infiltration (Fassbender *et al.*, 2002). Other available strategies (antibodies against adhesion molecules, chemical compounds that prevent PMN adhesion or mice deficient in adhesion molecules) have also given controversial results. Here, we demonstrate for the first time with two different methods directed either against all white blood cells (vinblastine), either specifically against PMN (mAb RP-3) that neutrophils would participate to brain infarct development. Nevertheless, it could exist a differential involvement of PMN between cortex and striatum since we confirmed, as previously demonstrated, that the vinblastine- or mAb RP-3-induced neutropenia only decreases cortical infarct volume but not striatal one. This dissociate effect could be related to a more pronounced reduction of blood flow in striatum than in cortex after MCA occlusion, as suggested by the lack of cortical protection induced by neutropenia in model of cerebral ischemia with a drastic drop in cortical blood flow (Abe *et al.*, 1988; Memezawa *et al.*, 1992). These data support the hypothesis of a possible link between vascular wall and polymorphonuclear leukocytes, in particular in penumbra, where cerebral blood flow is decreased but not nearly null as in core.

Several works have demonstrated that PMN modulation could modify endothelial function of blood vessel. Indeed, in a canine experimental I/R model, adenosine, which is known to diminish PMN recruitment during extended reperfusion, preserved endothelial function (Budde *et al.*, 2004). In isolated bovine mesenteric arteries, perfusion of PMN decreased endothelial relaxing response to ACh. This effect was cancelled by superoxide dismutase supplementation suggesting involvement of ROS (De Kimpe *et al.*, 1993). In addition, PMN activation by injection of phorbol ester impaired ACh-mediated endothelium relaxation without affecting the relaxation due to endothelium-independent mechanisms. This phenomenon might favour cerebral vasoconstriction, particularly resulting in augmented vessel responses to aggregating platelets (Akopov *et al.*, 1994a). One of mechanisms to explain cerebral vasospasm previously described in subarachnoid haemorrhage models, is the impairment of endothelium-dependent relaxation of cerebral arteries associated with enhanced expression in the basilar artery of ICAM-1, which promotes adhesion and infiltration of leukocytes (Handa *et al.*, 1991; 1995; Akopov *et al.*, 1996a).

We demonstrated here with two different methods that pharmacologically induced neutropenia prevents postischemic endothelial dysfunction, suggesting that activation of leukocytes and their adhesion to endothelium could contribute to occurrence of endothelial dysfunction. In contrast, induction of a neutropenia has no significant effect on both Kir2.x-dependent smooth muscle relaxation and endothelium-independent relaxing response. This dissociate effect supports our hypothesis that mechanisms underlying endothelial dysfunction and Kir2.x-dependent smooth muscle alteration are different. This differential effect could explain that in previous works, we found that an antioxidant agent prevented Kir2.x current impairment but not endothelial dysfunction, while in a model of ischemic tolerance with pleiotropic effect there was a protection of both smooth muscle and endothelial dysfunctions (Bastide *et al.*, 2003; Pétrault *et al.*, 2004). This dissociate effect points out that endothelial dysfunction is likely not directly related to ROS such as superoxide anion, contrasting

with the probable direct effect of these free radicals on ion channels. Indeed, oxidative damages of cell membranes (lipid peroxidation and protein oxidation) have been shown to impair ion channels and electrical properties of vascular smooth muscle (Kourie, 1998).

The molecular mechanisms of endothelial dysfunction remain to be discussed. The decrease of endothelial response to ACh could not be explained by an alteration of constitutive NO synthase since it has been reported that endothelium NOS expression was increased during cerebral I/R (Leker *et al.*, 2001). PMN are able to produce oxidative stress by membrane-associated NADPH oxidase, which participates to the production of superoxide anion, and by myeloperoxidase activation, which releases hypochloric acid, another powerful oxidant (Babior, 2000; Witko-Sarsat *et al.*, 2000). It has been shown that the cerebral oxidative stress, which can be evaluated by glutathione levels measurement, was concomitant with the presence of PMN in brain parenchyma (Beray-Berthat *et al.*, 2003). Therefore, PMN could constitute one of mechanisms of endothelial alteration by their oxidative interactions with NO, resulting in a decrease of its bioavailability consecutive to peroxynitrite formation. Otherwise, active MMPs, proteases released by activated leukocytes, increased degradation of extracellular matrix and altered endothelial barrier permeability and the blood vessel integrity. The loss of microvessel extracellular matrix is also associated with the loss of endothelial reactivity during focal ischemia (Del Zoppo & Mabuchi, 2003). Recent studies have shown that PMN were responsible for release of pro-MMP-9 but not of pro-MMP-2 during cerebral ischemia in the rodent, which contributed to worsen brain infarct lesion and to occur hemorrhagic transformations (Heo *et al.*, 1999; Asahi *et al.*, 2000; 2001a,b; Justicia *et al.*, 2003). The relationship between pharmacologically mediated neutropenia and endothelial function prevention supports hypothesis that PMN play a crucial role in occurrence of endothelium injury beyond its pathophysiological involvement in extent of neuronal lesions.

The parallel occurrence of endothelial protection and decrease of infarct volume raise also the question of the link between these two phenomena. Our data could suggest that pharmacological protection of endothelium is involved in neuroprotection associated with neutropenia. Protection of endothelium could contribute to increase neuroprotection whereas it is only not the determinant factor. Thus, while RP3- and vinblastine-induced neutropenia were associated with a similar endothelial protection, there was a difference in level of neuroprotection between the two strategies. In contrast, we demonstrated recently that a pure antioxidant was able to limit the extent of ischemia despite lack of endothelial protection but in parallel with prevention of Kir2.x-dependent mechanisms impairment. In a model of ischemic tolerance by a low dose of lipopolysaccharide, we found a prevention of both endothelial dysfunction and Kir2.x-dependent mechanisms impairment because of its pleiotropic effects (Bastide *et al.*, 2003). Nevertheless, the mAb RP-3-induced neutropenia, which induced a comparable level of neuroprotection to LPS, does not prevent Kir2.x-dependent relaxation impairment. Our results point out that involvement of the different compartments of vascular wall is complex. Further experiments with other pharmacological agents will be necessary to prove the relationship between vasculoprotection and neuroprotection.

In conclusion, we demonstrate for the first time that PMN participate to endothelial dysfunction occurrence in course of cerebral ischemia, suggesting that a pharmacological modulation of their activation could contribute to neuroprotection.

References

- ABE, K., ARAKI, T. & KOGURE, K. (1988). Recovery from edema and of protein synthesis differs between the cortex and caudate following transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Neurochem.*, **51**, 1470–1476.
- AKOPOV, S.E., SERCOMBE, R. & SEYLAZ, J. (1994). Endothelial dysfunction in cerebral vessels following carotid artery infusion of phorbol ester in rabbits: the role of polymorphonuclear leukocytes. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **14**, 1078–1087.
- AKOPOV, S., SERCOMBE, R. & SEYLAZ, J. (1996a). Cerebrovascular reactivity: role of endothelium/platelet/leucocyte interactions. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, **8**, 11–94.
- AKOPOV, S.E., SIMONIAN, N.A. & GRIGORIAN, G.S. (1996b). Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke*, **27**, 1739–1743.
- ASAH, M., ASAH, K., JUNG, J.C., DEL ZOPPO, G.J., FINI, M.E. & LO, E.H. (2000). Role of matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **20**, 1681–1689.
- ASAH, M., SUMII, T., FINI, M., ITOHARA, S. & LO, E. (2001a). Matrix metalloproteinase 2 gene knockout has no effect on acute brain injury after focal ischemia. *Neuroreport*, **12**, 3003–3007.
- ASAH, M., WANG, X., MORI, T., SUMII, T., JUNG, J., MOSKOWITZ, M., FINI, M. & LO, E. (2001b). Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knockout on the proteolysis of blood–brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J. Neurosci.*, **21**, 7724–7732.
- 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.
- BASTIDE, M., GELE, P., PETRAULT, O., PU, Q., CALIEZ, A., ROBIN, E., DEPLANQUE, D., DURIEZ, P. & BORDET, R. (2003). Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide in parallel to ischemic tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **23**, 399–405.
- BEAUCHAMP, P., RICHARD, V., TAMION, F., LALLEMAND, F., LEBRETON, J.P., VAUDRY, H., DAVEAU, M. & THUILLEZ, C. (1999). Protective effects of preconditioning in cultured rat endothelial cells: effects on neutrophil adhesion and expression of ICAM-1 after anoxia and reoxygenation. *Circulation*, **100**, 541–546.
- BERAY-BERTHAT, V., CROCI, N., PLOTKINE, M. & MARGAILL, I. (2003). Polymorphonuclear neutrophils contribute to infarction and oxidative stress in the cortex but not in the striatum after ischemia–reperfusion in rats. *Brain Res.*, **987**, 32–38.
- BABIOR, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.*, **109**, 33–44.
- BRADLEY, K.K., JAGGAR, J.H., BONEV, A.D., HEPPNER, T.J., FLYNN, E.R.M., NELSON, M. & HOROWITZ, B. (1999). Kir2.1 encodes the inward rectifier potassium channel in rat arterial smooth muscle cells. *J. Physiol.*, **515**, 639–651.
- BUDDE, J., MORRIS, C., VELEZ, D., MURAKI, S., NING-PING, W., GUYTON, R. & ZHI-QING, Z. (2004). Reduction of infarct size and preservation of endothelial function by multidose intravenous adenosine during extended reperfusion. *J. Surg. Res.*, **116**, 104–115.
- CAI, H. & HARRISON, D.G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ. Res.*, **87**, 840–844.
- CIPOLLA, M.J. & CURRY, A.B. (2002). Middle cerebral artery function after stroke: the threshold duration of reperfusion for myogenic activity. *Stroke*, **33**, 2094–2099.
- CIPOLLA, M.J., MCCALL, A.L., LESSOV, N. & PORTER, J.M. (1997). Reperfusion decreases myogenic reactivity and alters middle cerebral artery function after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, **28**, 176–180.
- DEL ZOPPO, G.J. & MABUCHI, T. (2003). Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **23**, 879–894.
- DE KIMPE, S.J., VAN HEUVEN-NOLSEN, D. & NIJKAMP, F.P. (1993). Acetylcholine-induced relaxation in bovine isolated mesenteric arteries is suppressed by polymorphonuclear leukocytes. *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 8–13.
- DREXLER, H. (1999). Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovasc. Res.*, **43**, 572–579.
- FASSBENDER, K., ROGOSCHKE, A., KUH, S., SZABO, K., FATAR, M., BACK, W., BERTSCH, T., KREISEL, S. & HENNERICI, M. (2002). Inflammatory leukocyte infiltration in focal cerebral ischemia: unrelated to infarct size. *Cerebrovasc. Dis.*, **13**, 198–203.
- FORMAN, L.J., LIU, P., NAGELE, R.G., YIN, K. & WONG, P.Y. (1998). Augmentation of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite production during cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *Neurochem. Res.*, **23**, 141–148.
- GAUTIER, S., PETRAULT, O., GELE, P., LAPRAIS, M., BASTIDE, M., BAUTERS, A., DEPLANQUE, D., JUDE, B., CARON, J. & BORDET, R. (2003). Involvement of thrombolysis in recombinant tissue plasminogen activator-induced cerebral hemorrhages and effect on infarct volume and postischemic endothelial function. *Stroke*, **34**, 2975–2979.
- HANDA, Y., KABUTO, M., KOBAYASHI, H., KAWANO, H., TAKEUCHI, H. & HAYASHI, M. (1991). The correlation between immunological reaction in the arterial wall and the time course of the development of cerebral vasospasm in a primate model. *Neurosurgery*, **28**, 542–549.
- HANDA, Y., KUBOTA, T., TSUCHIDA, A., KOBAYASHI, H. & KAWANO, H. (1995). Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on the cerebral artery following subarachnoid haemorrhage in rats. *Acta Neurochir.*, **132**, 92–97.
- HEO, J.H., LUCERO, J., ABUMIYA, T., KOZIOL, J.A., COPELAND, B.R. & DEL ZOPPO, G.J. (1999). Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **19**, 624–633.
- HAYWARD, N.J., ELLIOTT, P.J., SAWYER, S.D., BRONSON, R.T. & BARTUS, R.T. (1996). Lack of evidence for neutrophil participation during infarct formation following focal cerebral ischemia in the rat. *Exp. Neurol.*, **139**, 188–202.
- JUSTICIA, C., PANES, J., SOLE, S., CERVERA, A., DEULOFEU, R., CHAMORRO, A. & PLANAS, A.M. (2003). 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.*, **23**, 1430–1440.
- KOURIE, J.I. (1998). Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am. J. Physiol.*, **275**, C1–C24.
- LAUDE, K., BEAUCHAMP, P., THUILLEZ, C. & RICHARD, V. (2002). Endothelial protective effects of preconditioning. *Cardiovasc. Res.*, **55**, 466–473.
- LEKER, R.R., TEICHNER, A., OVADIA, H., KESHET, E., REINHERZ, E. & BENHUR, T. (2001). Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ischemic penumbra: relationship to expression of neuronal nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor. *Brain Res.*, **909**, 1–7.
- 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.
- LOVE, S. (1999). Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.*, **9**, 119–131.
- MARRELLI, S.P., JOHNSON, T.D., KHOROVETS, A., CHILDRES, W.F. & BRYAN, R.M. (1998). Altered function of inward rectifier potassium channels in cerebrovascular smooth muscle after ischemia/reperfusion. *Stroke*, **29**, 1469–1474.

- MATSUO, Y., KIHARA, T., IKEDA, M., NINOMIYA, M., ONODERA, H. & KOGURE, K. (1995). Role of neutrophils on radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **15**, 941–947.
- MCGIRT, M.J., LYNCH, J.R., PARRA, A., SHENG, H., PEARLSTEIN, R.D., LASKOWITZ, D.T., PELLIGRINO, D.A. & WARNER, D.S. (2002). Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, **33**, 2950–2956.
- MEMEZAWA, H., MINAMISAWA, H., SMITH, M.L. & SIESJÖ, B.K. (1992). Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp. Brain Res.*, **89**, 67–78.
- MORI, T., NAGATA, K., TOWN, T., TAN, J., MATSUI, T. & ASANO, T. (2001). Intracisternal increase of superoxide anion production in a canine subarachnoid hemorrhage model. *Stroke*, **32**, 636–642.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. (1986). *The Rat Brain Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: London.
- PÉTRAULT, O., BASTIDE, M., COTELLE, N., GELE, P., GAUTIER, S., LAPRAIS, M., VAMECQ, J., DURIEZ, P. & BORDET, R. (2004). The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivate di-tert-butylchalcone is parallel to preventive effect on post-ischemic Kir2.x impairment but not to post-ischemic endothelial dysfunction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **370**, 395–403.
- SEKIYA, S., GOTOH, S., YAMASHITA, T., WATANABE, T., SAITOH, S. & SENDO, F. (1989). Selective depletion of rat neutrophils by *in vivo* administration of a monoclonal antibody. *J. Leukoc. Biol.*, **46**, 96–102.
- TAKIZAWA, T., TADA, T., KITAZAWA, K., TANAKA, Y., HONGO, K., KAMEKO, M. & UEMURA, K.I. (2001). Inflammatory cytokine cascade released by leukocytes in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Res.*, **23**, 724–730.
- WITKO-SARSAT, V., RIEU, P., DESCAMPS-LATSCHA, B., LESAVRE, P. & HALBWASCHS-MECARELLI, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.*, **80**, 617–653.

(Received August 2, 2004

Revised October 15, 2004

Accepted December 1, 2004)

Article n°2

Neutrophils contribute to intracerebral hemorrhages after recombinant tissue plasminogen activator treatment in cerebral ischemia

Sophie Gautier*; Thavarak Ouk*, Olivier Petrault, Jacques Caron, Régis Bordet

British Journal of Pharmacology 2009 :sous presse

RESEARCH PAPER

Neutrophils contribute to intracerebral haemorrhages after treatment with recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischaemia

Sophie Gautier*, Thavarak Ouk*, Olivier Petrault*, Jacques Caron and Régis Bordet

EA1046 – Département de Pharmacologie médicale, Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Université de Lille 2 – Faculté de Médecine, Centre Hospitalier Universitaire, Lille, France

Background and purpose: Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) contribute to the vascular damage caused by transient cerebral ischaemia. Here we have evaluated the role of PMNs in intracerebral haemorrhage (ICH) induced in a model of thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator (t-PA) during the acute phase of cerebral ischaemia.

Experimental approach: The middle cerebral artery (MCA) of male spontaneously hypertensive rats was occluded for 1 h followed by reperfusion and, 5 h later, infusion of thrombolytic products (generated *in vitro* by t-PA on autologous clots). Effects of pretreatment (before the MCA occlusion) with vinblastine (4 days before; 0.5 mg kg⁻¹), monoclonal anti-neutrophil antibody (mAbRP3; 12 h, 0.3 mg kg⁻¹) or saline on ICH, neutrophil infiltration, MCA vascular reactivity and brain infarct volume were assessed, 24 h after the beginning of reperfusion.

Key results: Depletion of circulating neutrophils significantly reduced t-PA-induced ICH (vinblastine, 4.6 ± 1.0; mAbRP3, 5.2 ± 1.0 vs. saline, 10.8 ± 2.7 haemorrhages; *P* < 0.05). This depletion was associated with a decrease in cerebral infiltration by neutrophils and a decrease of endothelium-dependent, vascular dysfunction in isolated MCA, induced by the ischaemia/reperfusion and t-PA treatment. Brain infarct volume was significantly decreased after vinblastine treatment (159 ± 13 mm³ vs. 243 ± 16 mm³ with saline; *P* < 0.01) but not after depletion with mAbRP3 (221 ± 22 mm³).

Conclusions and implications: Our results showed that pharmacological depletion of PMNs prevented t-PA-induced ICH, in parallel with a decrease in cerebral infiltration by PMNs and a decreased endothelial dysfunction in cerebral blood vessels. *British Journal of Pharmacology* (2009) 1, ***. doi:10.1038/sj.bjp.0702362

Keywords: stroke; haemorrhages; t-PA; neutrophils; vascular endothelium

Abbreviations: ICH, intracerebral haemorrhage; I/R, ischaemia/reperfusion; MCAO, middle cerebral artery occlusion; t-PA, tissue plasminogen activator; TLP, thrombolysis products

Introduction

Although clot lysis with recombinant tissue plasminogen activator (t-PA) is effective in acute ischaemic stroke, it is also associated with a risk of haemorrhage, especially deleterious for the patients (Hacke *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1995). Many hypotheses have been proposed to explain the intracerebral haemorrhages (ICH) during thrombolysis (Tejima *et al.*, 2001), and using adjunctive pharmacological strategies could be one of the interesting ways to prevent these serious complications.

We previously demonstrated the role of t-PA-induced clot lysis in ICH in a mechanical thrombolysis-related brain bleeding model based on the post-ischaemic perfusion of a solution resulting from the *in vitro* interaction between t-PA and blood clots, leading to thrombolysis products (TLP) (Gautier *et al.*, 2003). In this model, perfusion of TLP increased the severity of ICH in comparison with the perfusion of t-PA alone, and was associated with a larger infarct volume and an increased vascular dysfunction in comparison with damage induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) alone. Moreover, the permeability of the blood-brain barrier (BBB) and metalloproteinase 9 (MMP-9) activity were also affected (Kahles *et al.*, 2005). These results added to those demonstrating impairment of vascular reactivity during t-PA treatment, in parallel to aggravation of brain injury (Cipolla *et al.*, 2000; Wang and Lo, 2003; Nassar *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007).

Correspondence: R. Bordet, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, 1 place de Verdun 59045 Lille cedex, France. E-mail: bordet@univ-lille2.fr

*These authors contributed equally to this work.

Received 1 August 2008; revised 29 September 2008; accepted 6 October 2008

présent adress: Laboratoire de Physiopathologie de la Barrière Hémato-Encéphalique, EA2465 Faculté des sciences Jean Perrin, 62307 Lens cedex

The link between brain injury, vascular impairment and t-PA-related ICH is not clearly defined. Reperfusion-generated free radicals are mediators of the extent of the infarct and of the impairment of vascular function (Petrault *et al.*, 2004), and use of antioxidant drugs concomitant to thrombolysis prevented ICH and decreased infarct size (Lapchak and Araujo, 2005). Neutrophils mediate inflammation and contribute to vascular and parenchymal damage (Del Zoppo and Mabuchi, 2003). Pharmacological inhibition of neutrophil emigration from the vasculature or neutrophil depletion after transient MCAO reduced the post-ischaemic alterations of vascular endothelium and in parallel reduced the infarct size (Emerich *et al.*, 2002; Petrault *et al.*, 2005). Activation of MMP-9 is responsible for matrix degradation and increased permeability of the BBB, associated with ICH (Kelly *et al.*, 2006), and inhibition of MMP-9 prevented t-PA-related ICH (Pfefferkorn and Rosenberg, 2003). Interestingly, MMP-9 is up-regulated by t-PA (Ning *et al.*, 2006), and the increased MMP-9 levels observed in infarcted areas were related to neutrophil infiltration into brain (Rosell *et al.*, 2008).

In the present study, we evaluated in our thrombolysis-related brain haemorrhage model, the contribution of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) on t-PA-induced haemorrhages, and in parallel, on vascular endothelial function and infarct volume, both affected during ischaemia and thrombolysis with t-PA. We used two methods to deplete neutrophils, a non-specific agent (vinblastine) and the more specific anti-neutrophil monoclonal antibody (mAbRP3).

Materials and methods

Animals

All experiments were performed in strict accordance with the guidelines of the National Institutes of Health and French Department of Agriculture. In our model, male spontaneously hypertensive rats (SHR) (Elevage Janvier, France), 10 weeks old and weighing 270 to 320 g, were used. The choice of SHR was based on the role of hypertension as a risk factor for haemorrhage during thrombolysis (Gautier *et al.*, 2003).

Experimental design

Three different groups of SHR were randomly selected: vehicle-treated group ($n = 9$), vinblastine-treated group ($n = 9$) and mAbRP3-treated group ($n = 9$). All rats were submitted to ischaemia/reperfusion (I/R) and perfused with a t-PA/clot solution, simulating thrombolysis. The rats included in the study were those that completed the whole protocol and had a histologically proven ischaemia.

Neutrophil depletion was induced by i.v. injection of vinblastine (0.5 mg kg^{-1} , 0.15 ml ; EG Labo) 4 days before I/R or by i.p. injection of mAbRP3 (0.3 mg kg^{-1} , 1 ml ; BD Pharmingen) 12 h before ischaemia and again during ischaemia (2 ml) (Sekiya *et al.*, 1990). The vehicle group received saline (0.9%).

Twenty four hours after reperfusion, animals were killed and tissues processed to assess vasoreactivity in the MCA and for immunohistochemical and histomorphometric analysis. Blood samples were collected before surgery for MCAO and

24 h later, to count leucocytes and PMNs (Machine XE 2100, Sysmex).

Cerebral ischaemia and t-PA treatment

Under anaesthesia (chloral hydrate 300 mg kg^{-1}), focal cerebral ischaemia was induced for 60 min by an occlusion of the right MCA with an intraluminal filament inserted in the external carotid artery to the internal carotid artery. Subsequently, the right jugular vein was cannulated with a polyethylene catheter (24 gauge). Physiological parameters (temperature, mean arterial pressure, arterial blood pH, PaO_2 and PaCO_2) were controlled throughout the experiments. After the occlusion, animals recovered from anaesthesia and were allowed to eat and drink freely. There was no evaluation of possible neurological deficits. To mimic thrombolysis *in vivo*, a solution of TLP was prepared *in vitro*, as follows. Autologous blood (0.2 ml) was taken from the jugular vein and left for 5 h to form a thrombus. To obtain TLP for perfusion, the thrombus was then fragmented, and t-PA [1.5 ml of t-PA 20 mg ml^{-1} ; this is equivalent to 10 mg kg^{-1} (6 ml kg^{-1}) of t-PA for each rat] was applied to the pieces of thrombus for 30 min. The resulting solution (TLP solution, containing mainly plasmin; total volume 2 ml) was collected and perfused slowly (over 1 h) into the rat, 6 h after ischaemia (Gautier *et al.*, 2003).

Assessment of ischaemia and evaluation of haemorrhages

Rats were anaesthetized with pentobarbitone (1 ml of 55 mg ml^{-1}) and the chest opened. Saline ($\text{NaCl } 0.9\%$; 60 ml) was perfused intracardially. Then the brain was rapidly removed and frozen at -80°C . Coronal slices ($20 \mu\text{m}$) were cut at 12 levels according to the stereotaxic section map of Paxinos and Watson. To locate the ischaemia, all sections were stained with cresyl fast violet, a marker of non-necrotizing cells, to permit differentiation between ischaemic and normal tissue. Infarct volume (in mm^3) was measured by using a numerical integration of the respective ischaemic areas for all sections per animal. The volume was corrected for oedema by using the following equation: corrected infarct volume = infarct volume $\times$ (right hemisphere volume/left hemisphere volume). Three defined sections ($+0.48$, -0.92 and -3.30 mm relative to Bregma) were histologically examined for ICH, without knowledge of the treatment group. The incidence of ICH was scaled according to a modified, previously described, method (Niessen *et al.*, 2003): 0 = no haemorrhages, 1 = multiple macroscopically visible haemorrhages (seen as petechiae). Severity was estimated as the number of petechial haemorrhages per infarct area. In some animals, *in vivo* magnetic resonance imaging was performed just before death in a 7 tesla narrow bore small animal imaging system (Biospec 70/20 USR, Bruker Biospin, Wissembourg, Germany). We acquired two dimensional T2-weighted images, using turboRARE pulse sequence: TR2500 ms, TE65 ms, FOV: $4 \times 4 \text{ cm}$, matrix: 256×256 , RARE factor 8.

Myeloperoxidase immunohistochemistry

Neutrophil infiltration was assessed by quantifying myeloperoxidase (MPO), an enzyme expressed in neutrophils

(Matsuo *et al.*, 1994). After fixation, sections were blocked and incubated with a 1:500 dilution of rabbit polyclonal anti-MPO primary antibody (DAKO) overnight at 4°C versus a negative control. Sections were then incubated with biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody for 3 h at room temperature, followed by an ABC process (ABC kit, Vector) and finally treated with diaminobenzidine. Neutrophil infiltration was quantified at one coronal level (+0.48 mm relative to Bregma) counting positive cells on six adjacent fields of 1 mm² in the ischaemic zone. As controls, we used brain sections of sham rats, submitted to surgery for MCAO, without advancing the intraluminal filament into the internal carotid artery and t-PA treatment.

Analysis of the vasoreactivity of isolated MCA

Endothelium-dependent and independent relaxations were assessed in a Halpern arteriograph (Living Systems Instrumentation, Burlington, Vermont, USA) (Petraut *et al.*, 2005). A proximal segment of the right MCA was mounted on two glass cannulas perfused with oxygenated Krebs solution maintained at 37°C and pH 7.4. Experiments were performed under no-flow conditions. The lumen diameter was measured by image analysis and recorded.

All mounted and pressurized arteries were stabilized at a transmural pressure of 100 mmHg for 1 h before experiments. Concentration-response curves for the relaxation to acetylcholine (ACh) were constructed by cumulative addition of ACh (0.001 to 10 µM). NO-mediated relaxations were determined with a single concentration of sodium nitroprusside (SNP 10 µM) on MCA pre-constricted with 5-HT. The vasorelaxant responses observed in MCAs from the three groups of SIHR (vehicle, vinblastine and mAbRP3) were compared with responses measured in MCAs from a control group of normotensive Wistar-Kyoto male rats, which served as control group for physiological conditions (Dupuis *et al.*, 2005). Relaxation responses were expressed as percentage of increase of the diameter of the pre-constricted artery.

Statistical analysis

All values were expressed as mean ± standard error mean (SEM). Continuous variables (infarct volumes, number of haemorrhages and MCA relaxation) were compared with a one-way ANOVA followed by a post hoc protected least significant difference (PLSD) Fisher test, if variance analysis was significant. A X² analysis was performed to compare results

expressed as frequency. A value of $P < 0.05$ was considered to indicate statistically significant differences between means.

Results

Physiological parameters (temperature, blood pressure and gases) remained within the normal range during the 1 h ischaemia and the beginning of reperfusion in all groups. Mortality was low and comparable in the different groups: two vehicle-treated rats and two mAbRP3-treated rats died before the end of the study protocol. At 24 h, group sizes were: vehicle, $n = 7$; vinblastine, $n = 9$ and mAbRP3, $n = 7$.

Effect of vinblastine or mAbRP3 on neutrophils

Animals pretreated with vinblastine or mAbRP3 had a significant reduction in circulating PMNs before the surgery for MCAO (falls of 98% and 54% respectively) and 24 h later (99% and 35% respectively; data not shown). After cerebral I/R and perfusion of TLP, neutrophils were found to have infiltrated the infarct zone (281 ± 117 PMN in vehicle-treated group vs. 2 ± 1 in vehicle sham-operated rats; $P < 0.05$). Treatment with vinblastine or mAbRP3 significantly reduced brain neutrophil infiltration, during I/R and TLP perfusion ($P < 0.05$) (Fig. 1). There was no neutrophil infiltration in the contralateral hemispheres.

Effect of neutrophil depletion on ICH

The ICHs induced by t-PA were confined to infarcted areas (Fig. 2A). In vehicle-treated rats, I/R and TLP perfusion induced visible petechial haemorrhages (Fig. 2B). Neutrophil depletion was associated with a reduction of the incidence of haemorrhage (-33% and -29% respectively; Table 1). When observed, the numbers of petechial haemorrhages were significantly decreased after neutrophil depletion (Table 1, $P < 0.05$). No haematomas were seen.

Effect on neutrophil depletion on cerebrovascular endothelium function

Vascular reactivity, assessed by 5-HT-induced contraction and endothelium-independent, relaxant responses to SNP, was similar in all groups (Table 2). As observed for vehicle-treated rats, I/R accompanied by TLP perfusion induced a significant loss ($P < 0.05$) in endothelium-dependent relaxing responses

Table 1 Histological examination of incidence and severity of intracerebral haemorrhages after ischaemia/reperfusion and tissue plasminogen activator treatment in rats treated with vehicle (saline 0.9%), vinblastine (0.5 mg kg⁻¹) or mAbRP3 (0.3 mg kg⁻¹)

	Histological score		Severity
	0 = no haemorrhage	1 = macroscopically visible haemorrhage	Mean number of petechial haemorrhages ± SEM
Vehicle ($n = 7$)	1	6	10.8 ± 2.7
Vinblastine ($n = 9$)	3	6	$4.6 \pm 1.0^*$
mAbRP3 ($n = 7$)	2	5	$5.2 \pm 1.0^*$

* $P < 0.05$ vs. vehicle.

bph_068

4

Neutrophils in t-PA-associated Haemorrhage
 S Gautier et al

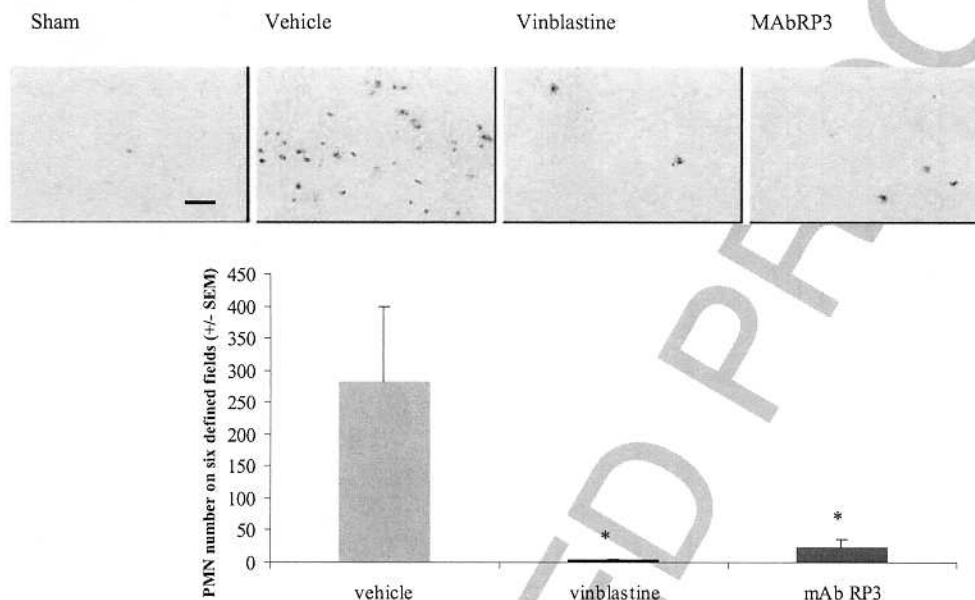


Figure 1 Effect of i.v. administration of vehicle (NaCl 0.9%), vinblastine (0.5 mg kg⁻¹) or mAbRP3 (0.3 mg kg⁻¹) on neutrophil infiltration in rats submitted to ischaemia/reperfusion and TLP treatment. Infiltration was quantified by counting cells positive to anti-MPO antibody on six adjacent fields of 1 mm² in ischaemic zones. Values are mean ± SEM. **P* < 0.05 vs. vehicle. Scale bar: 100 µm. MPO, myeloperoxidase; PMN, polymorphonuclear neutrophil; TLP, thrombolysis products.

Table 2 Vasoreactive effects of acetylcholine (Ach), 5-HT and sodium nitroprusside (SNP) on middle cerebral artery

	Control	24 h after ischaemia/reperfusion and tissue plasminogen activator treatment		
		Vehicle	Vinblastine	mAbRP3
Ach 10 µM (% relaxation)	20 ± 1.1	9.2 ± 0.5*	23.4 ± 5.1#	20.5 ± 3.8#
EC ₅₀ (µM)	0.036 ± 0.008	0.127 ± 0.027*	0.019 ± 0.010#	0.005 ± 0.002#
SNP 10 µM (% relaxation)	58.36 ± 5.18	46.1 ± 12.6	66.0 ± 11.6	66.7 ± 19.7
5-HT 1 µM (% constriction)	29.41 ± 3.80	34.6 ± 3.0	39.1 ± 3.1	33.4 ± 4.2

The EC₅₀ to Ach was calculated from dose-response curves. Values are mean ± SEM.

**P* < 0.05 vs. control.

#*P* < 0.05 vs. vehicle.

to increasing doses of Ach, as compared with control. This endothelial dysfunction was significantly prevented by neutrophil depletion (*P* < 0.05, Table 2). Sensitivity to Ach (as EC₅₀) was decreased during I/R and TLP perfusion, but this decrease was prevented when PMNs were depleted (*P* < 0.05; Table 2).

Effect of neutrophil depletion on cerebral infarct size

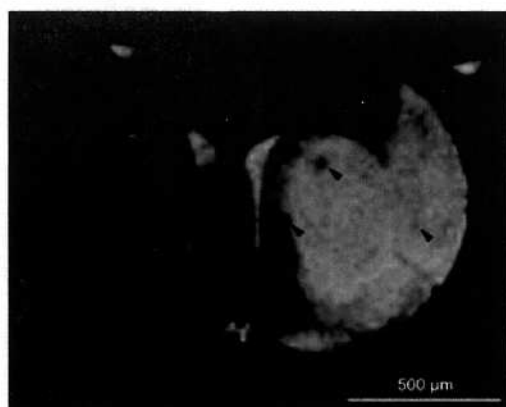
Polymorphonuclear neutrophil depletion induced by vinblastine induced a significant decrease in both total and cortical infarct volume (159 ± 13 mm³ and 105 ± 14 mm³ respectively in vinblastine-treated group vs. 243 ± 16 mm³ and 183 ± 13 mm³ in vehicle-treated rats; *P* < 0.01) (Fig. 3). PMN depletion induced by mAbRP3 was not associated with a significant decrease in total and cortical infarct volumes

(221 ± 22 mm³ and 167 ± 20 mm³ respectively in mAbRP3-treated rats). There was no difference in striatal infarct size in all three experimental groups.

Discussion

In the present work, we demonstrated that ICH associated with the use of t-PA in cerebral ischaemia can be partially prevented by depletion of PMNs. In our experimental model of thrombolysis-related brain haemorrhage, vinblastine and mAbRP3 decreased the incidence and severity of ICH. In parallel, these treatments reduced neutrophil infiltration in infarcted areas as well as preventing the endothelial dysfunction induced by the combination of I/R and TLP perfusion. The prevention of t-PA-induced ICH was not associated with

A



B



Figure 2 Effect of i.v. administration of vehicle (NaCl 0.9%), vinblastine (0.5 mg kg⁻¹) or mAbRP3 (0.3 mg kg⁻¹) on haemorrhagic risk in rats submitted to ischaemia/reperfusion and thrombolysis products treatment. Intracerebral haemorrhages were confined to infarct areas as seen *in vivo* on T2-weighted MRI images (A). Petechial haemorrhages were macroscopically visible on histological sections (B).

a decrease in infarct size, as treatment with vinblastine or mAbRP3 did not have the same protective effect.

In our experimental model of thrombolysis-related brain haemorrhage, we provided evidence of the crucial role of neutrophils in t-PA-induced ICH. Previous studies have already highlighted the role of neutrophils in the pathophysiology of cerebral ischaemia and neuronal death, through vascular and brain damage (Emerich *et al.*, 2002; Petrault *et al.*, 2005; McColl *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). In haemorrhagic consequences of cerebral ischaemia, the role of neutrophils is complex because circulating neutrophils do not seem to be significant contributors (Harris *et al.*, 2005) whereas the numbers of cerebral infiltrating neutrophils are significantly associated with these complications, via MMP-9 (Wang and Lo, 2003; Rosell *et al.*, 2008). In spontaneous ICH, the role of neutrophils is controversial as inflammatory mediators released from activated neutrophils participate in

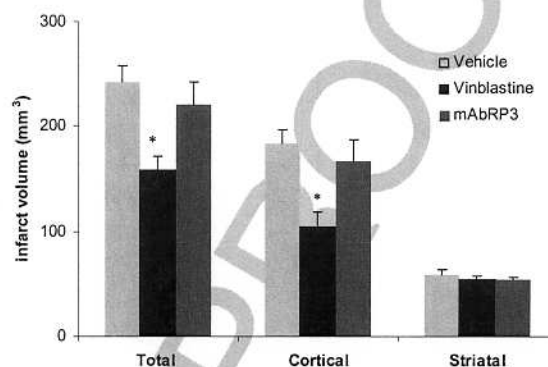


Figure 3 Effect of i.v. administration of vehicle (NaCl 0.9%), vinblastine (Vb: 0.5 mg kg⁻¹) or mAbRP3 (0.3 mg kg⁻¹) on total, cortical and striatal infarct volume (corrected for oedema). All rats were submitted to ischaemia/reperfusion and thrombolysis products treatment. (**P* < 0.05 vs. vehicle). Volumes are expressed in mm³ (mean ± SEM).

the functional deficit after ICH, whereas administration of G-CSF, stimulator of the neutrophil granulocyte lineage, has beneficial effects on this ICH-associated deficit, through an anti-inflammatory effect (Park *et al.*, 2005). Our work showed for the first time that neutrophils are directly implicated in t-PA-induced ICH in cerebral ischaemia.

Our data also suggested that neutrophils were involved in t-PA-induced haemorrhages by their interactions with cerebral vasculature rather than by their effects on cerebral tissue. Vinblastine and mAbRP3 prevent post-ischaemic and TLP-induced endothelial dysfunction as demonstrated by the effect on the relaxing responses of the MCA, which is an indirect index of arteriolar damage, as the proximal part of the artery is structurally different from the distal part. The specific depletion of neutrophils induced by mAbRP3 diminished the haemorrhagic risk of thrombolysis and prevented the (I/R and TLP)-induced alterations of endothelial response to Ach (a marker of endothelial function), to the same extent as vinblastine, while there was a difference between the two treatments in terms of their effect on infarct size. This difference could be explained by the pleiotropic effect of vinblastine, inducing a non-specific depletion of leukocytes and also interfering with other cell types, such as platelets. This difference in reduction of infarct size between vinblastine and mAbRP3 was disclosed in the SHR, which are more susceptible to ischaemia than normotensive rats (Coyle, 1986). We have previously demonstrated that the same dose of mAbRP3 was protective in normotensive rats (Petrault *et al.*, 2005). This difference is interesting for the purpose of our work, as it demonstrates the lack of correlation between decreased infarct size and reduced t-PA-induced ICH, although severity and duration of ischaemia are often described as a risk factor for haemorrhagic sequelae after thrombolysis (Larrue *et al.*, 1997; Thomalla *et al.*, 2007). These data highlight a stronger link between vascular lesions and thrombolysis-related haemorrhages, through leukocyte-endothelium interactions.

The vascular impact of the *in situ* activation of PMN has been described in various experimental models of I/R (Akopov

et al., 1994; Ishikawa *et al.*, 2004). It is probably linked to rolling and adhesion of PMN to the endothelium, following increased expression of adhesion proteins (selectins and cell adhesion molecules) (Okada *et al.*, 1994). However, neutrophil adhesion alone cannot explain all the vascular lesions, and a major role is probably also played by migration of PMN towards the infarct zone across the endothelium and, more generally, through the vessel wall (Justicia *et al.*, 2006). Given that neutrophils are responsible for vascular damage (loss of tight junctions and proteolysis of the extracellular matrix among others), this phenomenon can favour the extravasation of red blood cells and thus ICH (Dijkhuizen *et al.*, 2002). Direct proof comes from the fact that PMN were observed to accumulate inside microvessels in the infarct area in parallel to t-PA-induced ICH (Kano *et al.*, 2000). Moreover, in human stroke, infiltrated PMN in infarcted areas are associated with breakdown of the BBB, degradation of basal lamina (via MMP-9 activation) and extravasation of blood (Rosell *et al.*, 2008).

The mechanisms by which neutrophils, vessels and t-PA interact remain to be determined in our model. Plasmin, resulting from clot lysis with t-PA, has already been implicated in the physiopathology of haemorrhagic complications, as plasmin is capable of activating leukocytes and thus increases BBB breakdown and vascular permeability (Montrucchio *et al.*, 1996; Xue and Del Bigio, 2001). In turn, PMN are responsible for the activation and release of metalloproteinases during cerebral ischaemia (Asahi *et al.*, 2000; Justicia *et al.*, 2003). It is now well proven that these proteases aggravate the infarction and contribute to the haemorrhagic risk of thrombolysis (Aoki *et al.*, 2002; Sumii and Lo, 2002; Castellanos *et al.*, 2003; Gidday *et al.*, 2005). Moreover, PMNs seem to be the main source of MMP-9 in haemorrhagic areas and particularly around brain microvessels (Rosell *et al.*, 2008). Finally, t-PA directly stimulated release of MMP-9 by degranulation of neutrophils (Cuadrado *et al.*, 2008).

Our results underline the importance of the contribution of neutrophils, probably through vascular damage, in the physiopathology of the t-PA-related ICH, independent of the infarct lesions. The prevention of leukocyte-endothelium interactions could constitute a development pathway for adjuvant treatments for thrombolysis, which would broaden the therapeutic window of t-PA. Some pharmacological agents (such as adhesion protein inhibitors or anti-PMN antibodies) may well be useful in this respect.

Acknowledgements

The authors thank Cécile Lecoite for her skilful technical assistance. They are grateful to the imaging platform of the Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique (IFR114) and to Florent Auger. This work was supported by the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais and by the Fondation Paul Hamel.

Conflict of interest

None.

References

- Akopov SE, Sercombe R, Seylaz J (1994). Leukocyte-induced acute endothelial dysfunction in middle cerebral artery in rabbits. Response to aggregating platelets. *Stroke* 25: 2246–2252.
- Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo EH (2002). Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury: mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 33: 271–277.
- Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH (2000). Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1681–1689.
- Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J *et al.* (2003). Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke* 34: 40–46.
- Cipolla MJ, Lessov N, Clark WM, Haley EC, Jr (2000). Postischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator. *Stroke* 31: 940–945.
- Coyle P (1986). Different susceptibilities to cerebral infarction in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive Sprague-Dawley rats. *Stroke* 17: 520–525.
- Cuadrado E, Ortega L, Hernández-Guillamon M, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Rosell A *et al.* (2008). Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol* 84: ••• in press. 207–14
- Del Zoppo GJ, Mabuchi T (2003). Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 879–894.
- Dijkhuizen RM, Asahi M, Wu O, Rosen BR, Lo EH (2002). Rapid breakdown of microvascular barriers and subsequent hemorrhagic transformation after delayed recombinant tissue plasminogen activator treatment in a rat embolic stroke model. *Stroke* 33: 2100–2104.
- Dupuis F, Atkinson J, Limiñana P, Chillon JM (2005). Captopril improves cerebrovascular structure and function in old hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 144 (3): 349–356.
- Emerich DF, Dean RL, Bartus RT (2002). The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Exp Neurol* 173: 168–181.
- Gautier S, Petrucci O, Gele P, Laprais M, Bastide M, Bauders A *et al.* (2003). Involvement of thrombolysis in recombinant tissue plasminogen activator-induced cerebral hemorrhages and effect on infarct volume and postischemic endothelial function. *Stroke* 34: 2975–2979.
- Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD *et al.* (2005). Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H558–H568.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, Von Kummer R *et al.* (1995). Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 274: 1017–1025.
- Harris AK, Ergul A, Kozak A, Machado LS, Johnson MH, Fagan SC (2005). Effect of neutrophil depletion on gelatinase expression, edema formation and hemorrhagic transformation after focal ischemic stroke. *BMC Neurosci* 6: 49.
- Ishikawa M, Cooper D, Arumugam TV, Zhang JH, Nanda A, Granger DN (2004). Platelet-leukocyte-endothelial cell interactions after middle cerebral artery occlusion and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 907–915.
- Justicia C, Panes J, Sole S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A *et al.* (2003). 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* 23: 1430–1440.
- Justicia C, Martín A, Rojas S, Gironella M, Cervera A, Panes J *et al.* (2006). Anti-VCAM-1 antibodies did not protect against ischemic

- damage either in rats or in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 421–432.
- Kahles T, Foerch C, Sitzer M, Schroeter M, Steinmeitz H, Rami A *et al.* (2005). Tissue plasminogen activator mediated blood-brain barrier damage in transient focal cerebral ischemia in rats: relevance of interactions between thrombotic material and thrombolytic agent. *Vasc Pharmacol* 43: 254–259.
- Kano T, Katayama Y, Tejima E, Lo EH (2000). Hemorrhagic transformation after fibrinolytic therapy with tissue plasminogen activator in a rat thromboembolic model of stroke. *Brain Res* 854: 245–248.
- Kelly MA, Shuaib A, Todd KG (2006). Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Exp Neurol* 200: 38–49.
- Lapchak PA, Araujo DM (2005). Reducing bleeding complications after thrombolytic therapy for stroke: clinical potential of metalloproteinase inhibitors and spin trap agents. *CNS Drugs* 15: 819–829.
- Larrue V, von Kummer R, del Zoppo G, Bluhmki E (1997). Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. Potential contributing factors in the European Cooperative Acute Stroke Study. *Stroke* 28: 957–960.
- McColl BW, Rothwell NJ, Allan SM (2007). Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms. *J Neurosci* 27: 4403–4412.
- Marler JR on the behalf of the National Institute of Neurological Disorders and stroke t-PA study Group (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 333: 1581–1587.
- Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T *et al.* (1994). Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke* 25: 1469–1475.
- Montrucchio G, Lupia E, De Martino A, Silvestro L, Savu SR, Cacace G *et al.* (1996). Plasmin promotes an endothelium-dependant adhesion of neutrophils. *Circulation* 93: 2152–2160.
- Nassar T, Akkawi S, Shina A, Haj-Vehia A, Bdeir K, Tarshis M *et al.* (2004). In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone. *Blood* 103: 897–902.
- Niessen F, Hilger T, Hoehn M, Hossmann KA (2003). Differences in clot preparation determine outcome of recombinant tissue plasminogen activator treatment in experimental thromboembolic stroke. *Stroke* 34: 2019–2024.
- Ning M, Furie KL, Koroshetz WJ, Lee H, Barron M, Lederer M *et al.* (2006). Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology* 66: 1550–1555.
- Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, Del Zoppo GJ (1994). P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* 25: 202–211.
- Park HK, Chu K, Lee ST, Jung KH, Kim EH, Lee KB *et al.* (2005). Granulocyte colony-stimulating factor induces sensorimotor recovery in intracerebral hemorrhage. *Brain Res* 1041: 125–131.
- Petrault O, Bastide M, Cotellet N, Gele P, Gautier S, Laprais M *et al.* (2004). The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivate di-tert-butylhydroxyphenyl is parallel to the preventive effect on post-ischemic Kir2.x impairment but not to post-ischemic endothelial dysfunction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 370: 395–403.
- Petrault O, Ouk T, Gautier S, Laprais M, Gelé P, Bastide M *et al.* (2005). Pharmacological neutropenia prevents endothelial dysfunction but not smooth functions impairment induced by middle cerebral artery occlusion. *Br J Pharmacol* 144: 1051–1058.
- Pfefferkorn T, Rosenberg GA (2003). Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces t-PA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 34: 2025–2030.
- Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamon M, Lo EH, Montaner J (2008). MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 39: 1121–1126.
- Sekiya S, Yamashita T, Sendo F (1990). Suppression of late phase enhanced vascular permeability in rats by selective depletion of neutrophils with a monoclonal antibody. *J Leukoc Biol* 48: 258–265.
- Sumii T, Lo EH (2002). Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 33: 831–836.
- Tejima E, Katayama Y, Suzuki Y, Kano T, Lo EH (2001). Hemorrhagic transformation after fibrinolysis with tissue plasminogen activator. *Stroke* 32: 1336–1340.
- Thomalla G, Sobesky J, Köhrmann M, Fiebach JB, Fiehler J, Zaro Weber O *et al.* (2007). Two tales: hemorrhagic transformation but not parenchymal hemorrhage after thrombolysis is related to severity and duration of ischemia: MRI study of acute stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator within 6 h. *Stroke* 38: 313–318.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007). The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184: 53–68.
- Wang X, Lo EH (2003). Triggers and mediators of hemorrhagic transformation in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 28: 229–244.
- Xue SM, Del Bigio MR (2001). Acute tissue damage after injections of thrombin and plasmin into rat striatum. *Stroke* 32: 2164–2169.
- Yang DY, Pan HC, Chen CJ, Cheng FC, Wang YC (2007). Effects of tissue plasminogen activator on cerebral microvessels of rats during focal cerebral ischemia and reperfusion. *Neurol Res* 29: 274–282.

Article n°3

Granulocyte colony-stimulating factor worsens fibrinolysis-induced hemorrhage complications despite its neuroprotective effect

Thavarak Ouk*, Sophie Gautier*, Catherine Lefebvre, Maud Laprais; Olivier Pétrault,

Régis Bordet

En préparation

Granulocyte colony-stimulating factor worsens fibrinolysis-induced haemorrhage complications, despite its neuroprotective effect.

Thavarak Ouk*, PharmD; Sophie Gautier*, PharmD, PhD; Catherine Lefebvre, MD; Maud Laprais;

Olivier Pétrault, PhD#; Régis Bordet, MD PhD

EA1046 – Département de Pharmacologie médicale

Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique ;

Université de Lille 2 – Faculté de Médecine ; Centre Hospitalier Universitaire ; Lille, France

Corresponding author:

Professor Régis Bordet

Laboratoire de Pharmacologie

Faculté de Médecine, 1 place de Verdun,

F-59045 Lille cedex, France

E mail : bordet@univ-lille2.fr

Tel.: +33 320 445 449 – Fax: +33 320 446 863

*these authors contributed equally to this work

present address: Laboratoire de Physiopathologie de La Barrière Hémato-Encéphalique, Faculté Jean Perrin, Lens, France

Acknowledgement :

The authors are grateful to the imaging platform of the Institut de Medecine Predictive et de Recherche Thérapeutique (IFR114) and to Florent Auger.

This work was supported by the Paul Hamel Fondation, the Conseil Régional Nord-Pas de Calais et the FEDER.

Full Title: Granulocyte colony-stimulating factor worsens fibrinolysis-induced haemorrhage complications despite its neuroprotective effect.

Cover Title : G-CSF worsens tPA-induced haemorrhages

Tables :

Table 1 : Incidence and severity of thrombolysis-induced intracerebral haemorrhages after G-CSF treatment

Figures :

Figure 1 : Effect of G-CSF or vehicle on infarct volume after ischaemia/reperfusion

Figure 2 : Middle cerebral artery dose-response to acetylcholine after ischaemia/reperfusion 24 hours (A) or 72 hours (B) after reperfusion. Prevention induced by vinblastine (C)

Figure 3 : Thrombolysis-induced haemorrhage 72h after reperfusion.

Figure 4 : Effect of G-CSF or vehicle after ischaemia/reperfusion and thrombolysis 72h after reperfusion on infarct volume (A), MCA vasoreactivity (B) and neutrophil infiltration (C).

Key words : stroke - thrombolysis – GCSF – haemorrhage – vascular endothelium

Abstract :

Background and purpose: Recent studies have described the neuroprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in stroke models. We evaluated the effects of G-CSF on thrombolysis- associated haemorrhages.

Methods: The middle cerebral artery (MCA) of male Wistar or spontaneously hypertensive rats (SHR) was occluded for 1 h followed by 72 h reperfusion. For SHR, mechanical thrombolysis-related brain bleeding was induced by infusion of thrombolytics products (generated in vitro by t-PA on autologous clots) 5h after the 1h-occlusion. Effects of G-CSF (60µg/kg) or saline, administered after 5h of reperfusion, on vascular reactivity, brain infarct extent, polymorphonuclear neutrophils (PMN) and tPA-induced haemorrhages were assessed.

Results: In MCAO model, G-CSF treatment impaired the endothelium-dependent relaxing response in context of ischemia/reperfusion (- 46 %) or not (- 26 %), likely related to G-CSF's action on PMN, in parallel to a reduced infarct extent ($139.71 \pm 22.96 \text{ mm}^3$ vs $193.97 \pm 10.45 \text{ mm}^3$ in vehicle-treated rats, $p < 0.05$). In thrombolysis-related brain bleeding model, haemorrhages were increased by G-CSF (10.3 ± 1.8 petechies per infarct area vs 4.1 ± 0.9 for saline-treated group; $p < 0.05$) despite a significant neuroprotective effect (infarct volume : $98.71 \pm 13.27 \text{ mm}^3$ in G-CSF-treated group vs $153.72 \pm 12.25 \text{ mm}^3$ in vehicle-treated group; $p < 0.05$) and in parallel to a persistent MCA endothelium-dependent dysfunction and a decreased PMN infiltration in infarct area (68.5 ± 6.9 positive cells vs 136.2 ± 25.2 in vehicle-treated group; $p < 0.05$).

Conclusions: These results highlight the potential deleterious effect of G-CSF on t-PA associated hemorrhages, despite its neuroprotective effects.

Introduction:

Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) is a haematopoietic cytokine that was initially used in the treatment of neutropaenia, in view of its effects on the proliferation and maturation of the granulocyte cell line. This cytokine also displays neuroprotective effect during brain ischaemia in animal models, via several mechanisms. Firstly, G-CSF exerts anti-inflammatory properties by regulating the JAK-STAT pathway and thus decreasing the release of cytokines (such as interferon- γ and tumour necrosis factor α) by leukocytes and increasing levels of inflammatory cytokine antagonists¹. Secondly, G-CSF has a particularly anti-apoptotic effect by modulating the PI3K/Akt pathway². Thirdly, G-CSF stimulates neuronal progenitor cells and their recruitment to the ischaemic area by promoting *in situ* neurogenesis, in line with a post-ischaemic functional recovery³. Lastly, stimulation of the migration and differentiation of neuronal haematopoietic stem cells also contributes to G-CSF's beneficial effect⁴.

A recent meta-analysis of 13 preclinical studies found that G-CSF decreased the infarct size and improved motor function recovery after the induction of brain ischaemia⁵. These results prompted researchers to test the potential neuroprotective effect of G-CSF in clinical trials⁶. One of the outstanding questions with respect to the design of future clinical studies is whether or not to combine G-CSF with thrombolysis with tissue plasminogen activator (t-PA), the therapeutic window of which has just been extended to four and a half hours after the onset of ischaemia⁷. Given the role played by polynuclear neutrophils in the physiopathology of the post-thrombolysis haemorrhagic complications⁸, we formed a hypothesis whereby G-CSF was likely to aggravate this risk by favouring granulocyte proliferation, maturation and survival and thus increasing the circulating neutrophil count.

The objective of this article was thus to (i) study G-CSF's effect on post-ischaemic endothelial dysfunction (concomitantly with its neuroprotective effect) in a transient, middle cerebral artery occlusion (MCAO) model of brain ischaemia-reperfusion and (ii) analyze the impact of G-CSF

administration on the tPA-induced haemorrhages in a mechanical, thrombolysis-related brain bleeding model.

Materials and methods:

All animal experiments were performed in strict accordance with the guidelines published by the National Institutes of Health and the French Department of Agriculture. We compared the effects of G-CSF in two different models of focal, cerebral ischaemia in rats versus a group of sham rats. Physiological parameters were monitored throughout the experiments.

The transient MCAO model

Male, normotensive Wistar rats (Elevage Janvier, France) weighing 270 to 320 g underwent an occlusion of MCA (induced by hour-long insertion of an intraluminal filament into the internal carotid artery) followed by 24 or 72 hrs of reperfusion, as previously described⁹. Vehicle (0.9% saline, 30 µL) or G-CSF (60 µg/kg; 30 µL, Amgen) were administered via subcutaneous injection 5 hours after the start of reperfusion. Neurological status, MCA vasoreactivity and infarct volume were assessed 24 and 72 hours after post-ischaemia reperfusion.

The mechanical, thrombolysis-related brain bleeding model

We used 10-week-old male, spontaneously hypertensive rats (SHRs, from Elevage Janvier) weighing 270 to 320 g. The choice of SHRs was justified by hypertension's role as a risk factor in haemorrhage during thrombolysis¹⁰. All rats underwent 1 hour of MCAO and 72 h of reperfusion. To simulate thrombolysis, a tPA/clot solution was prepared *in vitro* from 0.2 mL of autologous blood left to clot for 5 hours. The thrombus was then broken up and incubated with 10 mg.kg⁻¹ tPA (6 mL.kg⁻¹, 2 mL) for 30 min. The resulting solution (referred to as a thrombus lysis product (TLP) solution) was infused 5 hours after the start of reperfusion. Vehicle (0.9% saline, 30 µL) or G-CSF (60 µg/kg; 30 µL, Amgen) were administered via subcutaneous injection just before administration of the TLP solution.

Middle cerebral artery vasoreactivity, cerebral neutrophil infiltration and infarct and haemorrhage characteristics were evaluated in this model 72 hours after ischaemia-reperfusion.

Measurement of locomotor activity

Induced neurological deficits for rats submitted to the MCAO model were evaluated after 24 and 72 hours of reperfusion¹¹. In the Bederson test, animals were scored as follows: 0= no deficit; 1= failure to extend the left forepaw fully; 2= circling to the left; 3= no spontaneous walking, with a depressed level of consciousness. An adhesive removal test was also carried out in order to measure somatosensory deficits¹².

Evaluation of infarct and haemorrhage

Twenty-four or 72 hours after reperfusion, rats were perfused with 60 mL of fresh saline just before sacrifice; the brains were rapidly removed and frozen. Coronal, 20 µm-thick slices were taken from 12 levels, according to Paxinos and Watson's stereotaxic atlas. Infarct volume (in mm³ and corrected for oedema) was quantified by digital integration of the respective ischaemic areas on all sections in a given animal.

For rats subjected to the mechanical thrombolysis-related brain bleeding model, blind histological evaluation of intracerebral haemorrhage was then performed on three defined sections (+0.48, -0.92 and -3.30 mm relative to the bregma). The incidence of ICH was scaled according to a previously described method¹³ : 0= no haemorrhage; 1 = multiple, macroscopically visible haemorrhages, seen as petechiae and 2 = haematoma. The severity of the ICH was deemed to correspond to the number of petechial haemorrhages or haematoma per infarct area. In some animals, *in vivo* magnetic resonance imaging was performed just before sacrifice in a 7-Tesla, narrow-bore small animal imaging system (Biospec 70/20 USR, Bruker Biospin, Wissembourg, France). We acquired two-

dimensional, T2-weighted images using a turboRARE pulse sequence (relaxation time: 2500 ms; echo time: 65 ms; field of view: 4 × 4 cm; matrix: 256 × 256, RARE factor: 8).

Vasoreactivity analysis

Endothelium-dependent and -independent relaxations were assessed in a Halpern arteriograph (Living Systems Instrumentation, Burlington, Vermont, USA) ¹⁴. We used a proximal segment of the right MCA perfused with oxygenated Krebs solution and maintained at 37°C and pH 7.4. The experiment itself was performed under no-flow conditions. The lumen diameter was measured using image analysis. The relaxant dose-response curve for acetylcholine (ACh) was determined by stepwise, cumulative addition (from 0.001 to 10 µM ACh). The NO-mediated, smooth muscle relaxant response was determined using a single concentration of sodium nitroprusside (SNP, 10 µM) on a serotonin-precontracted MCA. Control groups were sham-operated Wistar rats for the MCAO model and normotensive Wistar-Kyoto male rats, which served as a control group under physiological conditions ¹⁵ for the mechanical thrombolysis-related brain bleeding model. Relaxant responses were expressed as the percent increase in the precontracted artery diameter.

Myeloperoxidase immunohistochemistry

In rats submitted to mechanical thrombolysis-related brain bleeding, neutrophil infiltration was quantified by assaying myeloperoxidase (MPO), an enzyme expressed by neutrophil cells, using a rabbit polyclonal anti-MPO primary antibody (DAKO, France) and revealed by treatment with an avidin:biotinylated enzyme complex (ABC kit, Vector, USA), as previously described¹⁶. Neutrophil infiltration was assayed in a coronal slice (+ 0.48 mm relative to the bregma) that featured positive cells on six adjacent, 1 mm² fields in an ischaemic zone. As a control, we used brain sections from sham rats.

Statistical analysis

All values were expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Continuous variables were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a *post hoc* protected least significant difference (PLSD) Fisher test if the ANOVA was significant. Results expressed as frequencies were compared using a chi-squared test. A *p* value <0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results:

(i) G-CSF decreases infarct size in ischaemic rats but does not modify ischaemia-induced neurological alterations.

The administration of 60 μ g/kg G-CSF to ischaemic rats 6 hours after MCAO led to a significant ($p<0.05$), 20% reduction in infarct size ($139.71 \pm 22.96 \text{ mm}^3$ in the G-CSF-treated group ($n=8$) versus $193.97 \pm 10.45 \text{ mm}^3$ in the vehicle-treated group ($n=10$), Figure 1A) after 24 hours of reperfusion. The level of protection was similar after 72 hours of reperfusion ($136.09 \pm 15.22 \text{ mm}^3$ in the G-CSF-treated group ($n=9$) versus $182.75 \pm 8.47 \text{ mm}^3$ in the vehicle-treated group ($n=11$); $p<0.05$) (Figure 1B). These G-CSF-induced decreases in infarct volume after 24 and 72 hours of reperfusion were not accompanied by functional recovery, since the groups did not differ in terms of the Bederson and the adhesive removal test scores at either time point (data not shown).

(ii) G-CSF alters endothelial function under both sham and ischaemic conditions

Vascular reactivity (as assessed by 5-HT contraction and the endothelium-independent relaxant response to SNP) was similar in all groups.

In the sham animals, G-CSF administration altered endothelium-dependent relaxation, in comparison to administration of vehicle alone ($p<0.05$). This vascular effect was more pronounced in animals sacrificed after 24 hours (Figure 2A) than in those sacrificed after 72 hours (Figure 2B). In sham animals, treatment with vinblastine (a non-specific, neutrophil-depleting agent) 4 days before G-CSF administration prevented the endothelial dysfunction otherwise induced by the cytokine (Figure 2C).

The endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine was significantly altered ($p<0.05$) in animals having undergone MCAO and reperfusion. The alteration induced by ischaemia and 24 hours of reperfusion was similar to that induced by G-CSF in sham animals (Figure 3A). The same level was observed after 72 hours of ischaemia-reperfusion (Figure 2B).

Hence, administration of G-CSF does not prevent post-ischaemic endothelial dysfunction and may even exacerbate alteration of endothelium-dependent relaxation, which is very pronounced 72 hours after ischaemia induction/reperfusion (Figure 2A and B).

(iii) G-CSF worsens tPA-induced haemorrhagic complications

Spontaneously hypertensive rats submitted to mechanical, thrombolysis-related brain bleeding presented significantly more frequent and more severe tPA-induced haemorrhagic complications when TLP solution had been preceded by G-CSF administration (Figure 3), as witnessed by a greater number of petechiae (10.3 ± 1.8 versus 4.1 ± 0.9 in the vehicle-treated animals, $p<0.05$, Table 1) and the unusual presence of haematoma (four G-CSF-treated animals concerned versus none of the vehicle-treated animals; $p<0.05$).

In parallel, G-CSF induced a significant reduction in infarct size ($98.71 \pm 13.27 \text{ mm}^3$ versus $153.72 \pm 12.25 \text{ mm}^3$ in the vehicle-treated animals, $p<0.05$; Figure 4A) and did not modify the alteration in endothelium-dependent relaxation (Figure 4B). Lastly, G-CSF administration significantly decreased

neutrophil infiltration into the infarcted zone (68.5 ± 6.9 positive cells versus 136.2 ± 25.2 in the vehicle-treated animals, $p < 0.05$) (Figure 4C).

Discussion:

Our present work confirmed the acute neuroprotective effect of G-CSF in MCAO models with normotensive and hypertensive animals. However, we demonstrated for the first time that G-CSF has a harmful vascular effect, as witnessed by (i) altered endothelium-dependent relaxation in the absence of an ischaemic background and (ii) worsening of the endothelial dysfunction induced by the ischaemia-reperfusion process in an MCAO model. This harmful effect may be related to G-CSF's action on polynuclear neutrophils, as suggested by the absence of damage following prior neutrophil depletion. Lastly, we demonstrated that G-CSF administration increases the risk of tPA-induced haemorrhage in a mechanical, thrombolysis-related brain bleeding model. This effect is observed concomitantly with a reduction in the size of the brain infarct and a decrease in neutrophil infiltration into the infarcted zone in a context of pronounced vascular endothelial dysfunction induced by ischaemia/reperfusion and thrombolysis.

The striking result of this work relates to the link between ischaemic damage and haemorrhage following tPA-induced thrombolysis. It was long considered that because the risk of haemorrhage was ten times greater for cerebral thrombolysis than for cardiac thrombolysis¹⁷, ischaemic damage to the brain parenchyma paved the way to haemorrhagic damage. Modelling work on post-thrombolysis haemorrhagic damage yielded similar results^{10, 18}. In our models, and despite the neuroprotective effect of G-CSF seen in both the normotensive and hypertensive rats (with the latter being more sensitive to the effects of ischaemia-reperfusion), we observed an accentuation in the post-thrombolysis

haemorrhagic complications. Hence, our results suggest that although an ischaemic background is a prerequisite for the occurrence of haemorrhagic complications, parenchymal damage alone is not sufficient and more general damage to the neurogliovascular unit must be involved.

In line with this hypothesis, we demonstrated for the first time that G-CSF administration has a negative impact on the artery in general and on endothelium-dependent relaxation of the MCA (an indirect measure of more distal arteriolar damage) in particular. In the absence of an ischaemic context, G-CSF induced a similar alteration in endothelial function to that produced by the brain ischaemia-reperfusion process itself. Under ischaemic conditions, G-CSF's vascular effect worsened post-ischaemic endothelial dysfunction in the MCAO model. This negative effect was not observed in a model of haemorrhagic complications - probably in light of the already more severe endothelial dysfunction present after ischaemia-reperfusion and thrombolysis¹⁰. The increased risk of post-thrombolysis haemorrhage which accompanies the endothelial dysfunction argues in favour of significant vascular involvement in the occurrence of post-thrombolysis haemorrhagic complications. In fact, extravasation of red blood cells (the starting point of the haemorrhage) correlates with changes in arteriolar endothelial cells, underpinned by degradation of the basal membrane and rupture of the blood-brain barrier^{19, 20}.

The mechanism by which G-CSF increases the risk of post-thrombolysis haemorrhage and exerts a harmful effect on vascular endothelial function is probably related to the factor's haematopoietic properties on granulocyte lines. Under ischaemic conditions, the alteration of the endothelium-dependent relaxation was abolished by pharmacologically induced neutropaenia, pointing out the importance of leukocyte-vascular endothelium interactions¹⁴. Using the mechanical thrombolysis-related brain bleeding model, this effect is parallel to a partial prevention of the risk of post-thrombolysis haemorrhage²¹. As G-CSF decreases parenchymatous infiltration by polynuclear neutrophils concomitantly with a worsening in haemorrhagic lesions, we suggest that the polynuclear neutrophils'

harmful action occurs directly at the vascular level. It has now been well established that the rolling and adhesion of polynuclear neutrophils during ischaemia are responsible for vascular alterations in the ischaemic area²². In addition, polynuclear neutrophils are the main source of MMP-9, which is particularly present in and around cerebral microvessels after a brain infarct²⁰. The activation of these proteases is known to be correlated with the risk of haemorrhage in animal models and in the clinic^{23, 24}. Furthermore, it has been shown that tPA directly stimulates MMP-9 release via neutrophil degranulation²⁵. Even though G-CSF's prevention of neutrophil infiltration into ischemic parenchyma probably accounts for the substance's neuroprotective effect (notably by decreasing the local inflammatory response²⁶), the cytokine's direct action on polynuclear neutrophils could explain its effect on haemorrhagic damage via vascular mechanisms.

Overall, our work highlights the need to take account of the potential aggravation of thrombolysis-induced haemorrhagic complications following the neuroprotective administration of G-CSF. This question should be integrated into and evaluated in clinical trials seeking to demonstrate the acute phase efficacy of G-CSF, as a proportion of the patients are likely to be treated with tPA.

References:

- (1) Klocke R, Kuhlmann MT, Scobioala S, Schäbitz WR, Nikol S. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for cardio- and cerebrovascular regenerative applications. *Curr Med Chem*. 2008;15:968-77.
- (2) Yata K, Matchett GA, Tsubokawa T, Tang J, Kanamaru K, Zhang JH. Granulocyte-colony stimulating factor inhibits apoptotic neuron loss after neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Res*. 2007;1145:227-38
- (3) Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG, Schäbitz WR. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115:2083-98
- (4) Todo K, Kitagawa K, Sasaki T, Omura-Matsuoka E, Terasaki Y, Oyama N, Yagita Y, Hori M. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances leptomeningeal collateral growth induced by common carotid artery occlusion. *Stroke*. 2008 ;39:1875-82.

- (5) Minnerup J, Heidrich J, Wellmann J, Rogalewski A, Schneider A, Schäbitz WR. Meta-analysis of the efficacy of granulocyte-colony stimulating factor in animal models of focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2008;39:1855-61.
- (6) Bath PM, Sprigg N. Colony stimulating factors (including erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and analogues) for stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(2):CD005207
- (7) Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri 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 Engl J Med*. 2008;359:1317-29.
- (8) Rosell A, Foerch C, Murata Y, Lo EH. Mechanisms and markers for hemorrhagic transformation after stroke. *Acta Neurochir Suppl*. 2008;105:173-8.
- (9) Bastide M, Bordet R, Pu Q, Robin E, Puisieux F, Dupuis B. Relationship between inward rectifier potassium current impairment and brain injury after cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:1309-15.
- (10) Gautier S, Petrault O, Gele P, Laprais M, Bastide M, Bauters A, Deplanque D, Jude B, Caron J, Bordet R. Involvement of thrombolysis in recombinant tissue plasminogen activator-induced cerebral hemorrhages and effect on infarct volume and postischemic endothelial function. *Stroke*. 2003;34:2975-9.
- (11) Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17:472-6.
- (12) Zhang L, Chen J, Li Y, Zhang ZG, Chopp M. Quantitative measurement of motor and somatosensory impairments after mild (30 min) and severe (2 h) transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurol Sci*. 2000;174:141-6.
- (13) Niessen F, Hilger T, Hoehn M, Hossmann KA. Differences in clot preparation determine outcome of recombinant tissue plasminogen activator treatment in experimental thromboembolic stroke. *Stroke*. 2003;34:2019-24.
- (14) Pétrault O, Ouk T, Gautier S, Laprais M, Gelé P, Bastide M, Bordet R. Pharmacological neutropenia prevents endothelial dysfunction but not smooth muscle functions impairment induced by middle cerebral artery occlusion. *Br J Pharmacol*. 2005;144:1051-8.
- (15) Dupuis F, Atkinson J, Limiñana P, Chillon JM. Captopril improves cerebrovascular structure and function in old hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2005;144:349-56.
- (16) Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke*. 1994;25:1469-75.
- (17) Larrue V, von Kummer R, del Zoppo G, Bluhmki E. Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. Potential contributing factors in the European Cooperative Acute Stroke Study. *Stroke*. 1997;28:957-60.
- (18) Kano T, Katayama Y, Tejima E, Lo EH. Hemorrhagic transformation after fibrinolytic therapy with tissue plasminogen activator in a rat thromboembolic model of stroke. *Brain Res*. 2000;854:245-8.

- (19) Dijkhuizen RM, Asahi M, Wu O, Rosen BR, Lo EH. Rapid breakdown of microvascular barriers and subsequent hemorrhagic transformation after delayed recombinant tissue plasminogen activator treatment in a rat embolic stroke model. *Stroke*. 2002;33:2100-4.
- (20) Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamon M, Lo EH, Montaner J. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke*. 2008;39:1121-6.
- (21) Gautier S, Ouk T, Petrault O, Caron J, Bordet R. Neutrophils contribute to intracerebral haemorrhages after treatment with recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol* 2009; in press.
- (22) del Zoppo GJ, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:879-94.
- (23) Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, Dávalos A. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34:40-6.
- (24) Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, Quintana M, Alvarez-Sabín J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation*. 2003;107:598-603.
- (25) Cuadrado E, Ortega L, Hernández-Guillamon M, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Rosell A, Montaner J. Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol*. 2008;84:207-14.
- (26) Sehara Y, Hayashi T, Deguchi K, Zhang H, Tsuchiya A, Yamashita T, Lukic V, Nagai M, Kamiya T, Abe K. Decreased focal inflammatory response by G-CSF may improve stroke outcome after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Res*. 2007;85:2167-74

Tables :

Table 1 Histologic examination of incidence and severity of intracerebral haemorrhages after 72 h of reperfusion in rats submitted to mechanical thrombolysis-related brain bleeding model and treated by vehicle (saline 0.9%) or G-CSF (60µg/kg; 30µL). *p<0.05 vs vehicle

Histologic score			Severity
0 = no	1 = macroscopically visible haemorrhages	2= hematoma	Mean number of petechial haemorrhages ± SEM

haemorrhage

Vehicle (n=9)	1	8	0	4.1 ± 0.9
G-CSF (n=10)	0	10	4*	10.3 ± 1.8 *

Figure 1 : Effect of subcutaneous administration of G-CSF (60µg/kg; 30µL) or vehicle (NaCl 0.9 %, 30µL) on infarct volume (corrected from oedema) in the MCAO model. Rats were submitted to ischemia/reperfusion for 24 h (1A) or 72h (1B). Volumes are expressed in mm³ (mean ± SEM). *p<0.05 vs vehicle.

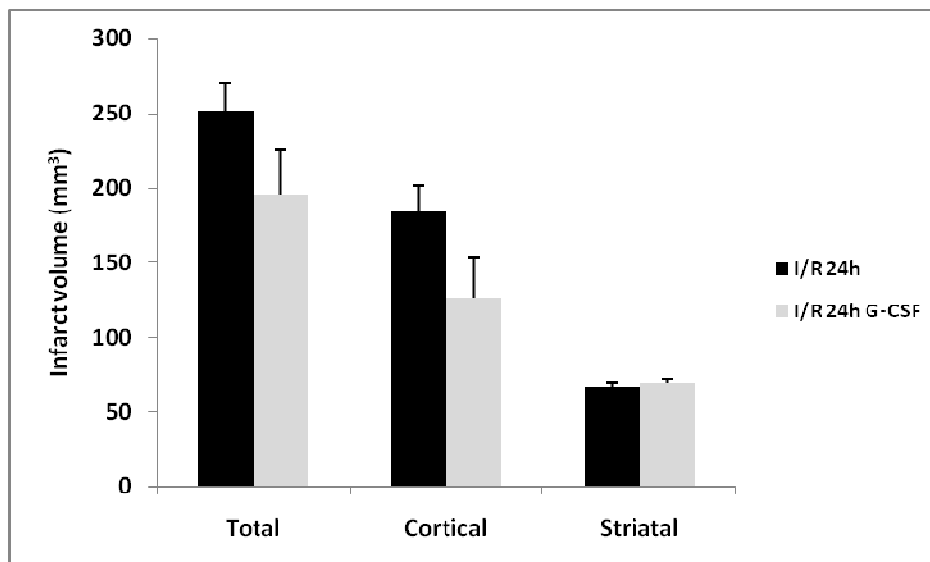
Figure 2 : Middle cerebral artery dose-response to acetylcholine after ischemia/reperfusion 24 hours (A) or 72 hours (B) after reperfusion. Rats received G-CSF (60µg/kg; 30µL) or vehicle (NaCl 0.9%; 30µL) 5 hours after the start of reperfusion. Maximal percentage of endothelial alteration was measured after i.v. administration of vinblastine 4 days before G-CSF treatment and after 24h and 72h perfusion (2C). Endothelial relaxation was expressed as percentage of change in diameter of precontracted arteries. Values are mean ± SEM. *p<0.05 vs sham.

Figure 3: Effect of subcutaneous administration of G-CSF (30µL) or vehicle (NaCl 0.9 %, 30µL) on tPA-induced haemorrhage 72h after reperfusion. Haemorrhages were seen in vivo on T2 weighted MRI images (A) and macroscopically visible on histological sections as petechiae or hematoma in the infarct area (B). Scale bar = 500µm.

Figure 4 : Effect of G-CSF (60µg/kg; 30µL) or vehicle (NaCl 0.9 %, 30µL) in rats submitted to mechanical thrombolysis-related brain bleeding model 72h after reperfusion : (A) on infarct volume (corrected from oedema). Volumes are expressed in mm³ (mean ± SEM). *p<0.05 vs vehicle ; (B) on middle cerebral artery dose-response to acetylcholine (endothelial relaxation expressed as percentage of change in diameter of precontracted arteries). Values are mean ± SEM. *p<0.05 vs control; (C) on neutrophil infiltration in infarct area. Infiltration was quantified by counting positive cells to anti-myeloperoxidase antibody on six adjacent fields of 1mm² on ischemic zone. Values are mean ± SEM. *p<0.05 vs vehicle. Scale bar : 100µm.

Figure 1 :

A



B

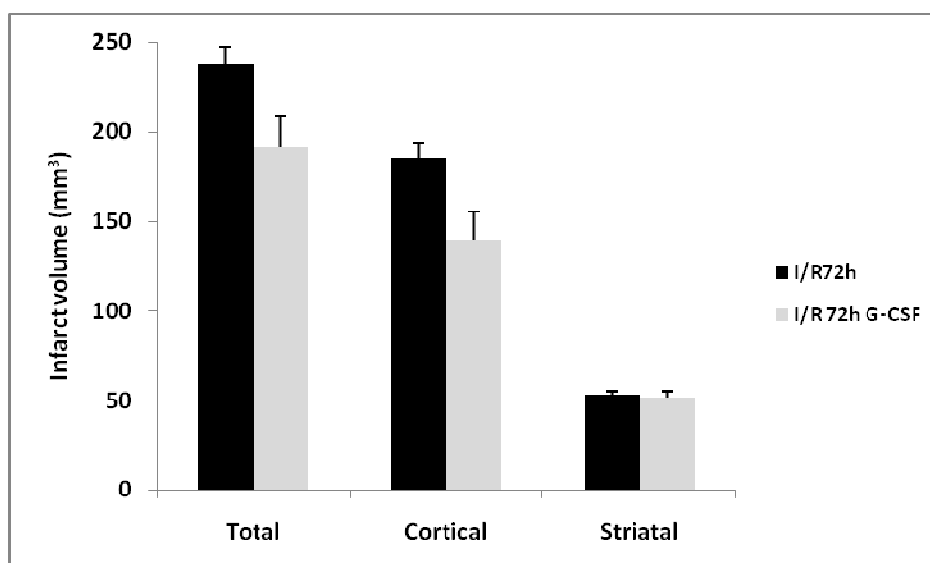
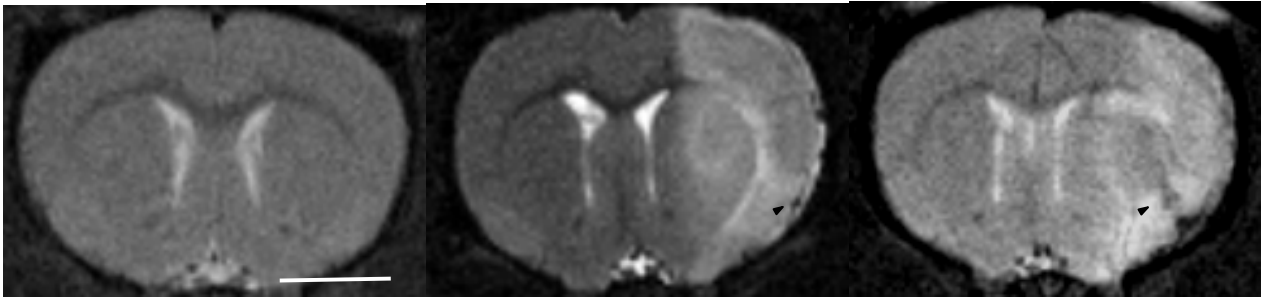


Figure 3 :

A

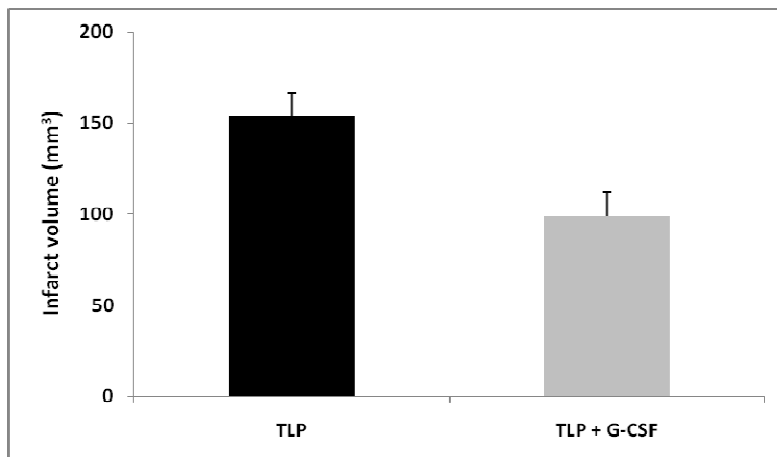


B

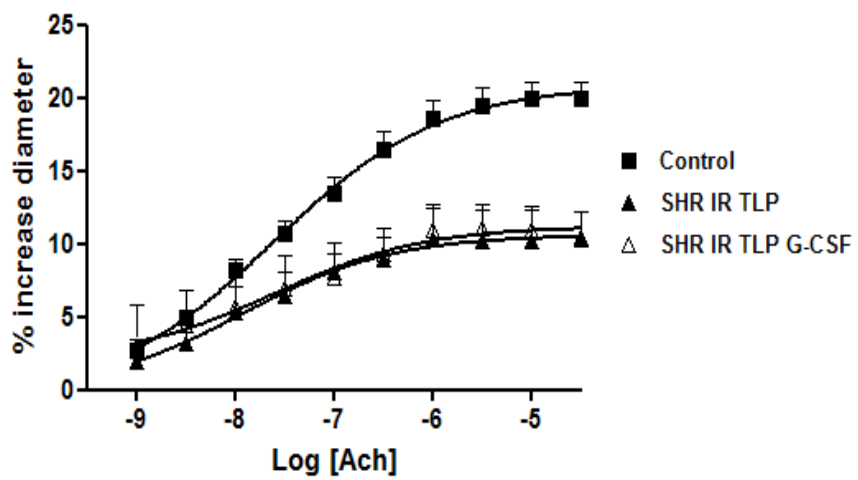


Figure 4 :

A



B

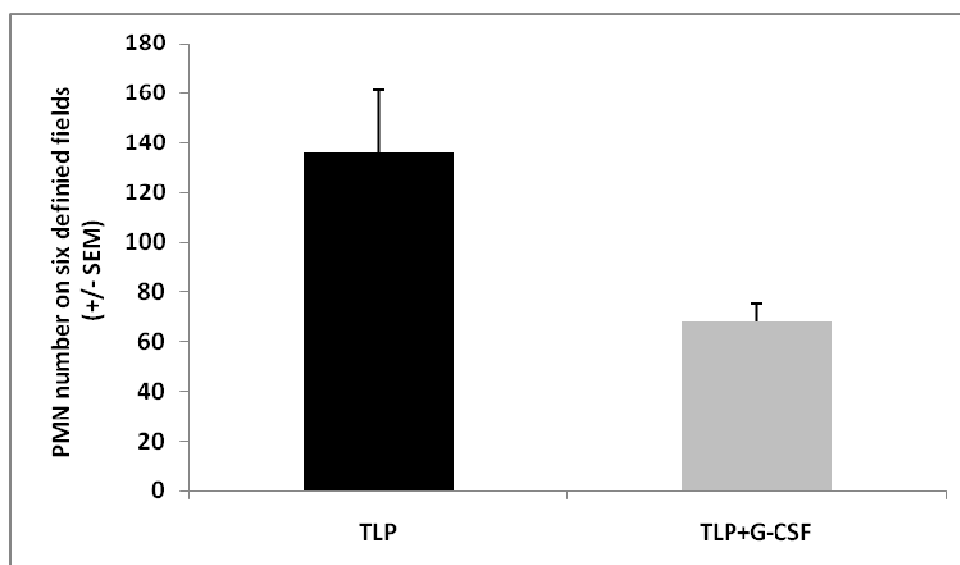


C

Control

Vehicle

G-CSF



Article n°4

Withdrawal of fenofibrate treatment partially abrogates preventive neuroprotection in stroke via loss of vascular protection

Thavarak Ouk, Maud Laprais, Michèle Bastide, Sophie Gautier, Régis Bordet

En préparation

Withdrawal of fenofibrate treatment partially abrogates preventive neuroprotection in stroke via loss of vascular protection

Thavarak Ouk, PharmD; Maud Laprais; Michèle Bastide, PhD; Sophie Gautier,
PharmD, PhD; Régis Bordet, MD, PhD

EA1046 – Département de Pharmacologie médicale

Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique;

Lille Nord of France University – Faculté de Médecine; Centre Hospitalier
Universitaire; Lille, France

Corresponding author:

Professor R. Bordet

Laboratoire de Pharmacologie

Faculté de Médecine, 1 place de Verdun

F-59045 Lille cedex

France

E-mail : bordet@univ-lille2.fr

Tel: +33 320 445 449 – Fax: +33 320 446 863

Abstract

To explore the mechanisms of action of preventive neuroprotection induced by PPAR- α activation, we have evaluated the neuronal, vascular and inflammatory effects of preventive treatment with fenofibrate up until the induction of experimental brain ischaemia in rats and fenofibrate treatment withdrawn 3 days before ischemia induction.

Fenofibrate (200mg/kg/day) was administered in rats for 14 days or withdrawn 3 days before induction of cerebral ischemia. Animals underwent a 1-hour middle cerebral artery occlusion (MCAo), followed by reperfusion for 24 hours. After sacrifice, the MCA's vasoreactivity was analyzed and brain sections were used to assess infarct size and inflammatory markers.

Preventive administration of fenofibrate significantly decreases the cerebral infarct volume. This neuroprotective effect was associated with partial prevention of post-ischemic endothelial dysfunction. However, withdrawal of the fenofibrate treatment 3 days before the induction of ischaemia reduced the neuroprotection and was less beneficial in preventing endothelial dysfunction. In contrast, fenofibrate significantly reduced microglial activation and neutrophil infiltration into the ischemic zone to a similar extent in both treatment modes.

Our results show that the neuroprotective effect of fenofibrate may be partially related to a preconditioning mechanism and the vascular protective effect appears rather to translate the acute effects of fenofibrate administration.

Keywords: cerebral ischemia, endothelium, PPAR- α , inflammation, rat

1. Introduction

The management of vascular and metabolic risk factors helps prevent the occurrence of a certain proportion of strokes (Donnan et al, 2008; Romano and Sacco, 2008). For strokes that occur despite the implementation of preventive measures, a pharmacological approach involving preventive neuroprotection might limit the functional consequences of these attacks. One model of preventive neuroprotection involves inducing resistance to ischaemia through use of a preconditioning regimen which would activate protective pathways and inhibit harmful pathways (Dirnagl et al, 2003; Gidday, 2006). Ideally, this type of preconditioning would preventively protect the brain against both the neuronal and vascular consequences of ischaemia. This preconditioning theory has prompted researchers to test the pre-stroke, neuroprotective effect of a certain number of registered drug classes (such as certain antihypertensive and hypolipidaemic agents) in primary or secondary prevention (Ginsberg, 2008). However, it is not known whether this is a real preconditioning effect or whether all or part of the preventive, neuroprotective effects result from the presence of the pharmacological agent in the organism at the time of ischaemia induction or occurrence.

In the mouse, the activation of PPAR receptors by the hypolipidaemic agent fenofibrate provides preventive neuroprotection when the drug is administered for 14 days prior to the experimental induction of ischaemia (Deplanque et al, 2003; Inoue et al, 2003). This neuroprotective effect results from activation of protective mechanisms (such as anti-oxidant enzymes) and inhibition of harmful mechanisms (particularly neuronal and vascular inflammatory pathways) (Bordet et al, 2006). By analogy with the observation that the preventive, neuroprotective effect of statins is not related to a preconditioning phenomenon (Gertz et al, 2003), we decided to study the respective impacts of preconditioning and acute effects in fenofibrate-induced preventive neuroprotection.

The goal of this work was thus to compare the neuronal, vascular and inflammatory consequences of (i) preventive treatment with fenofibrate up until the induction of experimental brain ischaemia in rats and (ii) fenofibrate treatment withdrawn some days before ischaemia induction.

2. Methods

2.1. Animals and drug administration

All experiments had been authorized by the local ethical committee and were performed in strict accordance with the guidelines issued by the National Institutes of Health and the French Department of Agriculture. We used male Wistar rats (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France) weighing 280-320 g in the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. Two types of diet were administered: a control diet (standard chow from Harlan) and a fenofibrate-enriched diet (the standard chow containing 0.2% of fenofibrate, corresponding to a dose of about 200 mg/kg and in accordance with previous results (Deplanque et al, 2003)).

Three groups of rats were randomly constituted and compared: one group received the control diet for 14 days ("control"), the second group received a fenofibrate-enriched diet for all 14 days before induction of cerebral ischaemia ("F-14d") and the third group received fenofibrate-enriched diet for 11 days, i.e. withdrawal 3 days before induction of cerebral ischaemia ("F-11d+3d"). All animals underwent a 1-hour MCAO, followed by reperfusion for 24 hours. After sacrifice, the MCA's vasoreactivity was analyzed and brain sections were used to assess infarct size and inflammatory markers. An additional group of sham-operated rats received the control diet 14 days before surgery and was used as a comparator for the vasoreactivity analysis.

2.2. The MCA occlusion model

Anaesthesia was induced by intraperitoneal (ip) chloral hydrate administration (300 mg/kg). A rectal probe was inserted and body temperature was maintained at 37 ± 0.5 °C with a heating lamp. The caudal artery was exposed, cannulated with a 24G polyethylene catheter and connected to a blood pressure monitor. The mean arterial blood pressure (MABP, mm Hg) was monitored throughout the experiment and blood samples were taken before, during and after ischaemia, in order to measure blood pH, arterial PaO₂ (mmHg) and arterial PaCO₂ (mmHg).

The ostium of the right MCA was occluded intraluminally, as previously described (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. The

pterygopalatine artery was exposed (by developing a plane alongside the internal carotid artery) and then ligated at its origin with a fine silk. An aneurysm clip was placed across internal carotid artery and an arteriotomy was made in the common carotid artery stump, allowing the introduction of a 4/0 monofilament nylon suture with its tip rounded by flame heating. Once the suture was in place, 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 circulatory system as far as in the narrow lumen at the start of the MCA. Mild resistance to this advancement indicated that the intraluminal occluder had entered the anterior cerebral artery. After 60 minutes, the suture was carefully removed, until its tip was blocked by a ligature placed on common carotid artery (to allow reperfusion). The caudal artery catheter was removed and the artery was ligated to prevent bleeding. The animals were placed in a cage to recover from anaesthesia at room temperature and were then allowed to eat and drink ad libitum. The sham operation consisted of the same manipulation but without introduction of the monofilament.

2.3. Infarct volume measurement

The rats were killed with an overdose of ip pentobarbital (200 mg/kg) 24 after reperfusion. Brains were rapidly removed and placed in ice-cold Krebs solution equilibrated with 5% CO₂ and 95% O₂. The MCAs were carefully dissected to prepare vascular smooth muscle cells (VSMCs) or for vasoreactivity analysis and thereafter brains were frozen and coronally dissected into 50 µm-thick slices on a cryostat at 12 levels in 1 mm steps, according to the Paxinos & Watson stereotaxic atlas (Paxinos & Watson, 1986). Sections were stained by cresyl fast violet. The unstained area of the brain was defined as the infarct zone. Infarcted cortical and subcortical areas and hemispheric areas were calculated separately for each coronal slice using image analysis software (Color Image 1.32, NIMH, Bethesda, MD, USA) after digitization. Next, total infarct volumes and hemispheric volumes (in mm³) were calculated by the summing the respective areas for all sections for all animals and the distance between them. Lastly, the total infarct volume was corrected for the brain oedema effect using the following equation: corrected infarct volume = total infarct volume - (left hemisphere volume/right hemisphere volume).

2.4. Arterial segment preparation and pressurized arteriography

A segment of dissected right MCA was mounted in a small vessel arteriograph (Living Systems Instrumentation, Burlington, VE, USA) on two glass cannulae perfused with Krebs solution. The artery was secured to the proximal and distal cannulae with nylon ties. The distal cannula was closed in order to work under "no flow" conditions. The arteriograph chamber was continuously supplied with Krebs solution equilibrated with 5% CO₂/95% O₂ and maintained at 37°C and pH 7.4. The proximal cannula was connected to a pressure transducer, a miniature peristaltic pump and a servo-controller that continually measured and adjusted transmural pressure (TMP). The entire arteriograph system was positioned on the stage of an inverted microscope equipped with a video camera and a display monitor. The lumen diameter was measured by video image dimension analysis. The output of the video dimension (which is proportional to diameter) was continuously fed to a digital tape recorder (DTR-1205).

All mounted and pressurized arteries were stabilized at a TMP of 75 mm Hg for 1 hour before experiments were performed. The spontaneous contraction response of cerebral arteries to pressure changes contributes to autoregulation of cerebral blood flow and is characteristic of the myogenic tone. The acetylcholine (ACh) relaxing dose-response was determined by cumulative addition of ACh (0.001 to 30 µM). To test NO-mediated smooth muscle relaxation, a single concentration of sodium nitroprusside (SNP 10 µM) was added to the bath after artery precontraction with 5-hydroxytryptamine (5-HT: 1 µM induced 90% of the maximum constriction).

2.5. Immunohistochemistry

After 24 hours of reperfusion, the rats were anesthetized and perfused through the heart with cold saline and 4% paraformaldehyde. After 24h of fixation in 4% paraformaldehyde at 4°C, the brains were cryoprotected in 20% and 30% sucrose solutions in phosphate-buffered saline (PBS) at 4°C. Frozen coronal sections (20µm thick) were prepared using a cryostat. Parallel sets of brain sections were immunostained with antibodies against CD11b (OX42, a marker for activated microglia), myeloperoxidase (MPO, a marker for neutrophils) and ICAM-1 to assess the effect of fenofibrate on post-ischaemic inflammation. After fixation, brain sections were blocked with 10% normal goat serum and incubated overnight at 4°C with mouse-anti rat

CD11b (1:500; MCA 275R, Serotec), rabbit polyclonal anti-MPO (1:500; A0398, DAKO) and mous-anti rat ICAM-1 (1:500, MCA 773, Serotec) antibodies. Next, sections were incubated with biotinylated horse anti-mouse IgG for CD11b and ICAM-1, and anti-rabbit IgG for MPO for three hours at room temperature, followed by treatment with an avidin:biotinylated enzyme complex (the ABC kit from Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and, lastly, diaminobenzidine tetrahydrochloride. As controls, we used brain sections incubated in the absence of primary antibodies.

Drugs and solutions

The ionic composition of the pH 7.4 physiological solution used for all vasoreactivity experiments was as follows (in mM): 119 NaCl, 24 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.17 MgSO₄·7H₂O, 10 glucose, 1.6 CaCl₂. All drugs (ACh, 5-HT, SNP, KCl and fenofibrate) were purchased from Sigma chemical Co. ACh, 5-HT, SNP were made fresh daily as 0.1 M stock solutions and stored at 4°C.

2.6. Data processing and statistical analysis

Spontaneous arterial tone was expressed evaluated as the percentage decrease in diameter from the fully relaxed diameter in papaverine and plotted at each diameter. The relaxing responses to ACh and SNP were respectively expressed as the percentage increase in the luminal diameter and the percentage of relaxation relative to basal tone after precontraction. The contracting responses to 5-HT were normalized against the maximum contracting response.

All values were expressed as the mean ± standard error mean (SEM). Continuous variables (infarct volumes, MCA relaxations) were compared with a one-way, inter-group analysis of variance (ANOVA), followed (when the ANOVA was significant) by a post-hoc protected least significant difference (PLSD) Fisher test. A value of p<0.05 was considered to be significant.

3. Results

3.1. Withdrawal of fenofibrate partially decreases its neuroprotective effect

A 14-day course of fenofibrate induced a significant ($p < 0.05$) decrease in total infarct volume ($202.31 \pm 8.54 \text{ mm}^3$), when compared with the control group ($281.55 \pm 8.26 \text{ mm}^3$) (Figure 1). We observed a 29.9% decrease in cortical infarct volume ($143.99 \pm 1.35 \text{ mm}^3$ in the F-14d group vs. $205.96 \pm 2.21 \text{ mm}^3$ in the control group; $p < 0.05$) and a 22.8% decrease in striatal infarct volume.

Withdrawal of fenofibrate 3 days before cerebral ischaemia induction partially abolished the neuroprotective effect of a 14-day fenofibrate treatment, as demonstrated by the difference between the two groups in terms of the total ($242.55 \pm 15.01 \text{ mm}^3$ in F-11d+3d group versus $202.31 \pm 8.54 \text{ mm}^3$ in F-14d group ; $p < 0.05$) and cortical infarct volumes ($177.49 \pm 3.99 \text{ mm}^3$ in F-11d+3d group versus $143.99 \pm 1.35 \text{ mm}^3$ in F-14d group ; $p < 0.05$). The administration of fenofibrate for 11 days, followed by a 3-day withdrawal, resulted in a significant decrease in both total infarct volume ($242.55 \pm 15.01 \text{ mm}^3$ in F-11d+3d group versus $281.55 \pm 8.26 \text{ mm}^3$ in control group ; $p < 0.05$) and cortical infarct volume ($177.49 \pm 3.99 \text{ mm}^3$ in F-11d+3d group versus $205.96 \pm 2.21 \text{ mm}^3$ in control group ; $p < 0.05$).

3.2. Pre-infarct withdrawal does not modify the fenofibrate-induced effect on post-ischaemic inflammation

Fourteen days of fenofibrate treatment prevented the ischaemia-induced increase in microglial activation, as demonstrated by comparison of the F-14d and control groups in terms of Ox-42 expression in ischaemic parenchymatous tissue. Withdrawal of fenofibrate 3 days before cerebral ischaemia induction did not change the effect of the preceding fenofibrate treatment, since Ox-42 expression in F-11d+3d group was similar to that seen in the F-14d group and was significantly lower than in the control group (Figure 2).

Furthermore, a 14-day fenofibrate treatment prevented the usual, ischaemia-induced increase in neutrophil polynuclear infiltration, as demonstrated by comparison of the F-14d and control groups in terms of the MPO expression in ischaemic parenchymatous tissue. The withdrawal of fenofibrate before cerebral ischaemia induction did not change the effect of

fenofibrate, since MPO expression in the F-11d+3d group was similar to that in the F-14d group and was significantly lower than in the control group (Figure 3).

In parallel, fenofibrate administration (with or without pre-infarct withdrawal) prevented vascular inflammation, as shown by lower ICAM-1 expression in the F-14d and F-11d+3d groups than in the control group (Figure 4).

3.3. Loss of the prevention of post-ischaemic endothelial dysfunction after fenofibrate withdrawal

Ischaemia-reperfusion induced a lower relaxation-response to ACh, compared with the sham-operated group (Figure 5). This post-ischaemic loss of endothelium-dependent relaxing response was prevented by a 14-day fenofibrate treatment. In contrast, after a 3-day withdrawal following 11 days of treatment, the relaxation response to ACh was significantly worse than after ischaemia-reperfusion alone. The endothelium-independent relaxation response to sodium nitroprusside and the contractile response to 5-HT were similar in all experimental conditions (Table 1).

4. Discussion

In the present work, we have demonstrated (in the rat) that a 14-day, pre-ischaemia administration of fenofibrate (a synthetic activator of the nuclear PPAR-alpha receptors) significantly decreases the cerebral infarct volume. This neuroprotective effect was associated with partial prevention of post-ischaemic endothelial dysfunction. However, withdrawal of the fenofibrate treatment 3 days before the induction of ischaemia reduced the level of neuroprotection and was less beneficial in maintaining endothelium-dependent relaxation. In contrast, fenofibrate significantly reduced microglial activation and neutrophil infiltration into the ischaemic zone to a similar extent in both treatment modes.

These results confirm the neuroprotective effect (in the rat) of fenofibrate administration prior to induction of brain ischaemia, as already seen in the mouse (Deplanque et al, 2003). Our findings are in good agreement with other studies having demonstrated the neuroprotective effect of modulating the nuclear PPAR receptors (Tureyen et al, 2007; Collino et al, 2006; Sundararajan et al, 2005; Inoue et al, 2003). Here, we observed a number of new mechanisms of action underlying fenofibrate's protective effect on cerebral parenchyma and blood vessels. The importance of an anti-inflammatory effect had already been suggested by the fact that fenofibrate abolishes the induction of vascular adhesion protein (ICAM-1, VCAM-1) expression in the ischaemic zone. Here, we showed that the decrease in infarct size is also associated with fenofibrate inhibition via two inflammatory pathways in brain ischaemia: (i) microglial activation and (ii) infiltration of blood neutrophils into the ischaemic focus. Prevention of neutrophil infiltration is consistent with fenofibrate's prevention of vascular adhesion protein induction.

The demonstrated inhibition of leukocyte-endothelium interactions probably explains the favourable effect of fenofibrate administration on endothelial dysfunction. This type of fenofibrate-mediated vascular effect had already been suggested by observation of (i) PPAR-alpha receptor expression in the endothelium (Touyz and Schiffrin, 2006) and (ii) a fenofibrate-driven increase in the endothelium-dependent response to ACh in the absence of ischaemia (Deplanque et al, 2003). Here, we showed for the first time that the fenofibrate-induced decrease in infarct size is associated with prevention of post-ischaemic alterations in

endothelium-dependent relaxation. This effect of fenofibrate testifies to the drug's ability to protect both the brain parenchyma and the vessel wall; moreover, dual protection is now considered to be essential for the optimal management of brain ischaemia (Takahashi and Macdonald, 2004). The fenofibrate-induced vascular protection may result from the drug's known anti-oxidant effect, in agreement with the work showing that administration of anti-oxidant agents (such as chalcone and stobadine) prevents post-ischaemic endothelial dysfunction (Petrault et al, 2004; Plaisier et al, 2008). The other mechanism probably involved is the inhibition of leukocyte-endothelium interactions - in agreement with the demonstrated role of neutrophils in post-ischaemic endothelial dysfunction (Petrault et al, 2005, Gautier et al, 2009).

The withdrawal of prolonged fenofibrate treatment 3 days before the induction of ischaemia caused a partial loss of neuroprotection, as witnessed by an infarct volume between that of the control group and that of the group treated with fenofibrate right up until ischaemia induction. This partial loss of fenofibrate's neuroprotective effect is reminiscent of the results obtained when statins are withdrawn prior to induction of ischaemia (Gertz et al, 2003). However, the loss of effect observed with fenofibrate is only partial, whereas it is total with statins - suggesting that different mechanisms are involved. Even though the neuroprotective effect disappears partially, the same is not true for the effect on parenchymatous inflammation, which remains unaffected. In contrast, the vascular protection effect disappears totally and is even accompanied by aggravated post-ischaemic impairment of endothelium-dependent relaxation. This phenomenon has already been described with statins (Gertz et al, 2003) and particularly at the vascular level, where the decreased expression of endothelial nitric oxide synthase (NOS) contrasts with the increased expression usually associated with neuroprotection (Laufs et al, 2002; Sironi et al, 2003; Endres et al, 2004). This observation testifies to the absence of vascular preconditioning, even though this type of mechanism has been shown in a model of brain preconditioning induced by low-dose bacterial lipopolysaccharide (Bastide et al, 2003). In contrast, a preconditioning effect can be legitimately proposed for the parenchymatous component of fenofibrate-induced brain protection, in as much as an anti-inflammatory effect remains some days after withdrawal of the drug.

The aggravation of post-ischaemic endothelial dysfunction following withdrawal of fenofibrate does not appear to involve leukocyte-endothelium interactions, inasmuch as the

effect on ICAM-1 protein expression persists after withdrawal of the drug. Two other hypotheses can be put forward. The first involves oxidative mechanisms, given that the latter's involvement in post-ischaemic endothelial dysfunction is well established (Petrault et al, 2004; Cipolla et al, 1997). The other hypothesis relates to a decrease in the expression of endothelial NOS (such as that observed after the withdrawal of statins) but which remains to be demonstrated. In addition to providing knowledge of the mechanism, the partial loss of the neuroprotective effect (in parallel with a total loss of vascular protection) underlines the importance of dual parenchymatous and vascular effects in obtaining the maximal effect of fenofibrate on brain protection; this is in agreement with the theories which place the neurovascular unit at the heart of the physiopathology of brain ischaemia (Lo, 2008; del Zoppo, 2006; Iadecola, 2004).

In conclusion, our results demonstrate that fenofibrate has a preventive, protective effect against brain ischaemia as a result of both neuroprotective and vasculoprotective components. Although the neuroprotective effect may (at least in part) be related to a preconditioning mechanism, the vascular protective effect appears rather to translate the acute effects of fenofibrate administration. Anti-inflammatory mechanisms (both parenchymatous and vascular) may play a crucial role in this preventive protective effect, which is clinically relevant and in line with the effect of hypolipidaemic agents revealed by cohort studies (Deplanque et al, 2006).

References

- Bastide M, Gelé P, Pétrault O, Pu Q, Caliez A, Robin E, Deplanque D, Duriez P, Bordet R., 2003. Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide in parallel to brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23, 399-405.
- 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, 1309-15.
- Bordet R, Ouk T, Petrault O, Gelé P, Gautier S, Laprais M, Deplanque D, Duriez P, Staels B, Fruchart JC, Bastide M., 2006. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans.* 34, 1341-6.
- Cipolla MJ, McCall AL, Lessov N, Porter JM., 1997. Reperfusion decreases myogenic reactivity and alters middle cerebral artery function after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 28, 176-80.
- Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Benetti E, Gallicchio M, Dianzani C, Danni O, Thiernemann C, Fantozzi R., 2006. Oxidative stress and inflammatory response evoked by transient cerebral ischemia/reperfusion: effects of the PPAR-alpha agonist WY14643. *Free Radic Biol Med.* 41, 579-89.
- Deplanque D, Gelé P, Pétrault O, Six I, Furman C, Bouly M, Nion S, Dupuis B, Leys D, Fruchart JC, Cecchelli R, Staels B, Duriez P, Bordet R., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. *J Neurosci.* 23, 6264-71.
- del Zoppo GJ., 2006. Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med.* 354, 553-5.
- Deplanque D, Masse I, Lefebvre C, Libersa C, Leys D, Bordet R. Prior TIA, lipid-lowering drug use, and physical activity decrease ischemic stroke severity. *Neurology.* 2006 Oct 24;67(8):1403-10.
- Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. 2003. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 26, 248-54.
- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM., 2008. Stroke. *Lancet.* 371, 1612-23.
- Endres M, Laufs U, Liao JK, Moskowitz MA. Targeting eNOS for stroke protection., 2004. *Trends Neurosci.* 27, 283-9.
- Gautier S; Ouk T, Petrault O, Caron J, Bordet R., 2009. Neutrophils contribute to intracerebral hemorrhages after recombinant tissue plasminogen activator treatment in cerebral ischemia. *Br J Pharmacol (in press)*
- Gertz K, Laufs U, Lindauer U, Nickenig G, Böhm M, Dirnagl U, Endres M., 2003. Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke.* 34, 551-7.
- Gidday JM., 2006. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci.* 7, 437-48.
- Ginsberg MD., 2008. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology.* 55, 363-89.

Iadecola C., 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5, 347-60.

Inoue H, Jiang XF, Katayama T, Osada S, Umesono K, Namura S., 2003. Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice. *Neurosci Lett.* 352, 203-6.

Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Böhm M, Nickenig G, Endres M., 2002. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Research* 942:23-30.

Lo EH., 2008. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br J Pharmacol.* 153 Suppl 1, S396-405.

Pétrault O, Ouk T, Gautier S, Laprais M, Gelé P, Bastide M, Bordet R., 2005. Pharmacological neutropenia prevents endothelial dysfunction but not smooth muscle functions impairment induced by middle cerebral artery occlusion. *Br J Pharmacol.* 144, 1051-8.

Pétrault O, Bastide M, Cotellet N, Gelé P, Gautier S, Laprais M, Vamecq J, Duriez P, Bordet R., 2004. The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivate di-tert-butylhydroxyphenyl is parallel to the preventive effect on post-ischemic Kir2.x impairment but not to post-ischemic endothelial dysfunction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 370, 395-403.

Plaisier F, Bastide M, Ouk T, Pétrault O, Laprais M, Stolc S, Bordet R., 2008. Stobadine-induced hastening of sensorimotor recovery after focal ischemia/reperfusion is associated with cerebrovascular protection. *Brain Res.* 1208, 240-9.

Romano JG, Sacco RL., 2008. Progress in secondary stroke prevention. *Ann Neurol.* 63, 418-27.

Sironi L, Cimino M, Guerrini U, Cavio AM, Lodetti B, Adsente M, Balduini W, Paoletti R, Tremoli E., 2003. Treatment with statins after induction of focal ischemia in rats reduces the extent of brain damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:322-327.

Sundararajan S, Gamboa JL, Victor NA, Wanderi EW, Lust WD, Landreth GE., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia. *Neuroscience.* 130, 685-96.

Takahashi M, Macdonald RL., 2004. Vascular aspects of neuroprotection. *Neurol Res.* 26 : 862-9.

Touyz RM, Schiffrin EL., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol.* 45, 19-28.

Tureyen K, Kapadia R, Bowen KK, Satriotomo I, Liang J, Feinstein DL, Vemuganti R., 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents. *J Neurochem.* 101, 41-56.

Legend of figures

Figure 1: Effect of withdrawal of fenofibrate on total, cortical and striatal infarct volume (corrected from oedema) induced by one hour focal cerebral ischemia and followed by 24 hours reperfusion period. Volumes are expressed in mm³ (mean ± SEM); n=8-12 animals per group. *p<0.05 as compared to control group; #p<0.05 as compared to F-14d group.

Figure 2 : Effect of withdrawal of fenofibrate on microglial activation in rats submitted to ischemia and reperfusion. Microglial activation was quantified by counting positive cells to anti-Ox42 antibody on six fields on ischemic zone. Values are mean ± SEM; n=4 animals per group. *p<0.05 as compared to control. Scale bar : 25 µm.

Figure 3: Effect of withdrawal of fenofibrate on neutrophil infiltration in rats submitted to ischemia and reperfusion. Neutrophil infiltration was quantified by counting positive cells to anti-MPO antibody on six fields on ischemic zone. Values are mean ± SEM; n=4 animals per group. *p<0.05 as compared to control. Scale bar : 100 µm.

Figure 4: Effect of withdrawal of fenofibrate on ICAM-1 expression in rats submitted to ischemia and reperfusion. n= 4 animals per group. Scale bar : 100 µm.

Figure 5: Dose-response curves to Ach for rats received control diet, fenofibrate 14 days or 11 days before ischemia/reperfusion. Endothelial relaxation was expressed as percentage of change in diameter of precontracted arteries in response to Ach. Values are mean ± SEM. *p<0.05 as compared to sham-operated group.

Figure 1

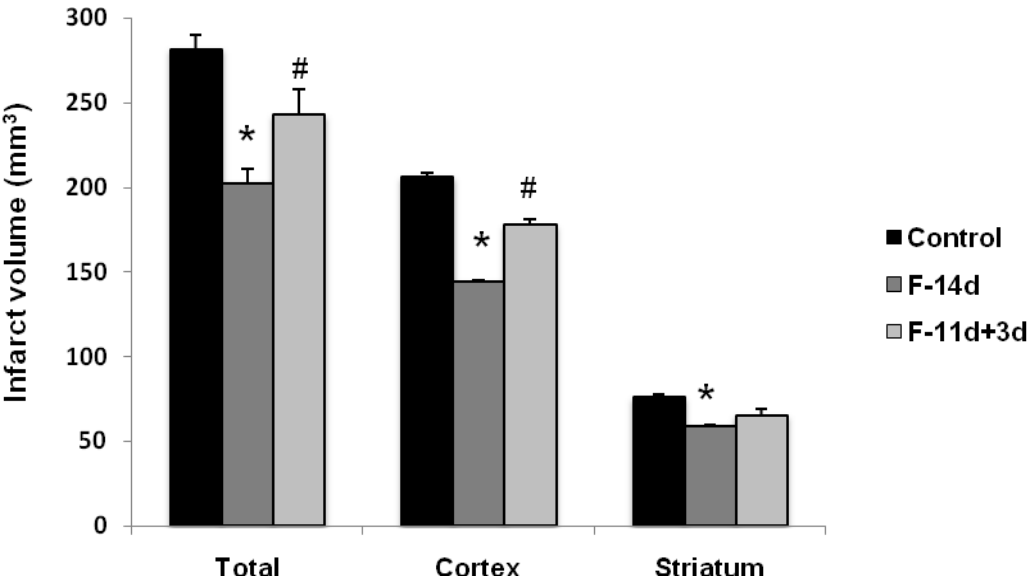


Figure 2

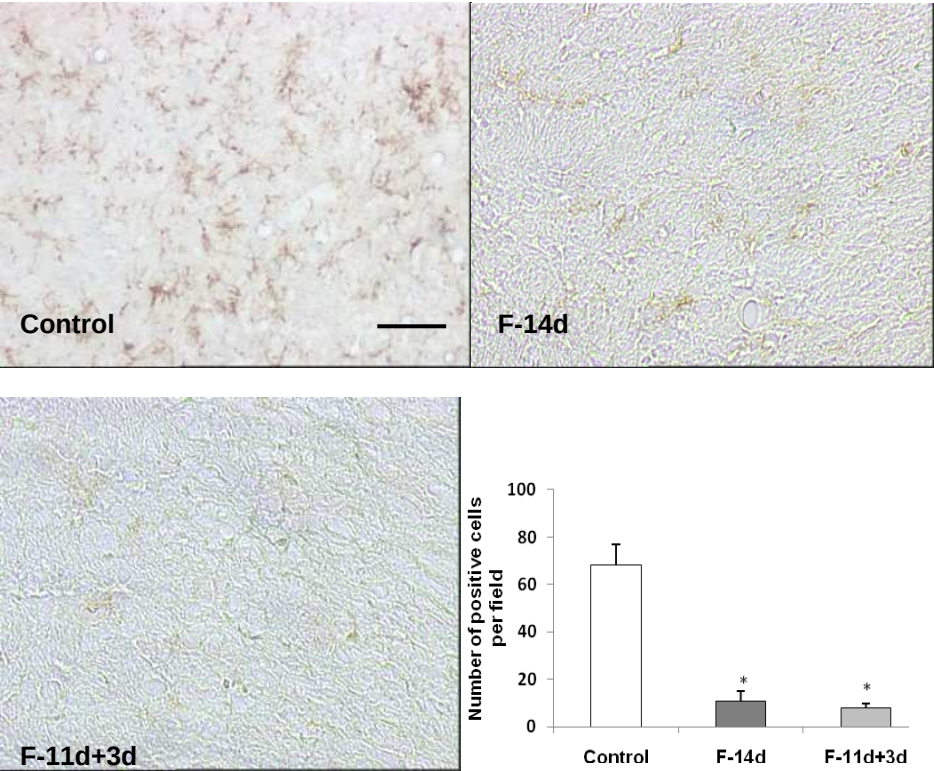


Figure 3

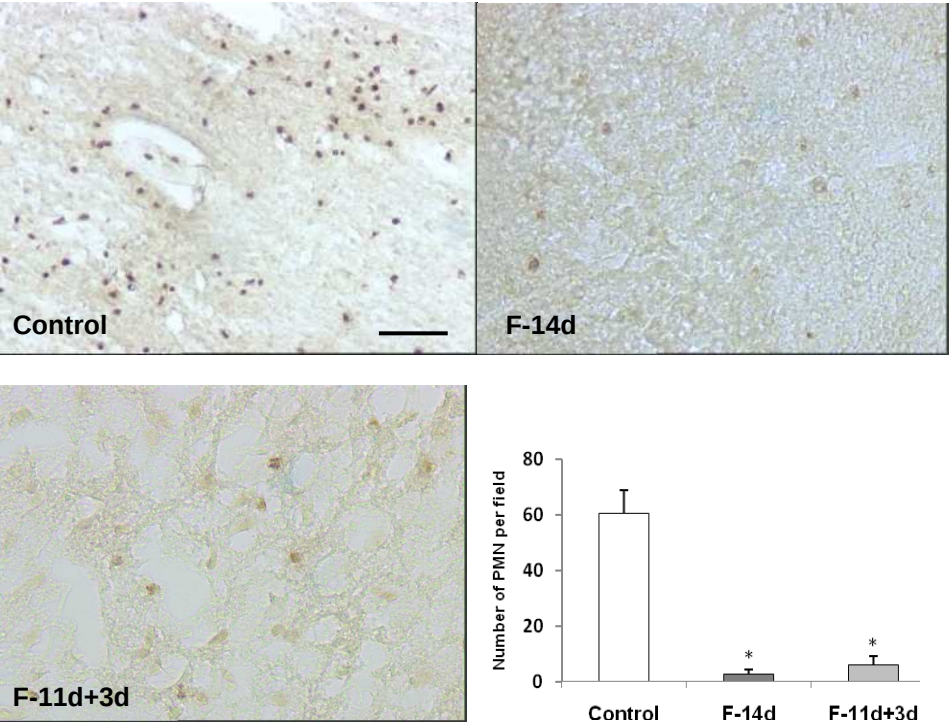


Figure 4

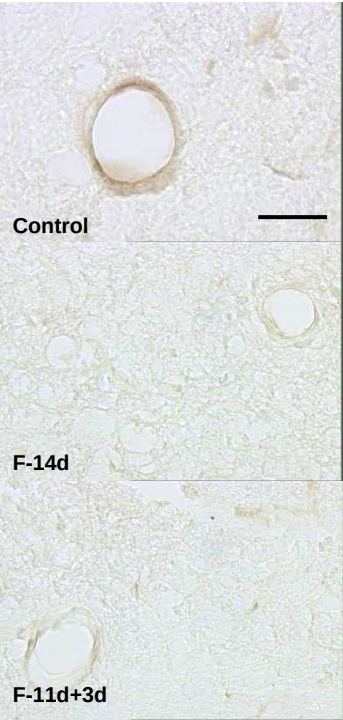


Figure 5

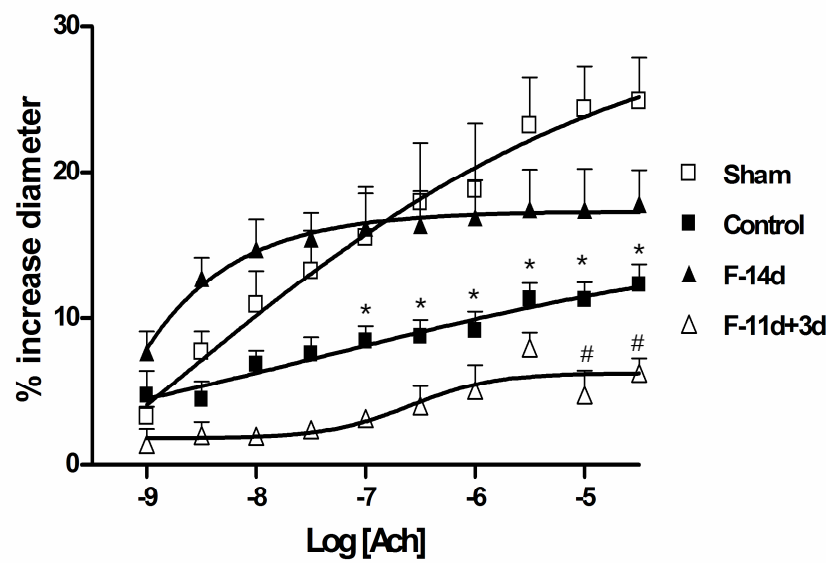


Table 1

Acetylcholine (Ach), serotonin (5-HT) and sodium nitroprusside (SNP) vasoreactive effects on middle cerebral artery (MCA). Values are mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ as compared to sham group; # $p < 0.05$ as compared to control group.

	Sham (n=6)	Control (n=6)	F-14d (n=5)	F-11d+3d (n=4)
Ach 30 μM (% increase diameter)	24.9 $\pm$ 3.0	12.3 $\pm$ 1.0*	17.8 $\pm$ 2.3	6.2 $\pm$ 1.4 [#]
5-HT 1μM (%constriction)	28.3 $\pm$ 2.0	21.4 $\pm$ 2.3	21.4 $\pm$ 2.9	20.5 $\pm$ 3.1
SNP 10 μM (% relaxation)	58.3 $\pm$ 5.2	52.4 $\pm$ 6.3	62.5 $\pm$ 4.0	51.4 $\pm$ 15.3

Article n°5

The PPAR-alpha activator fenofibrate as a potential adjuvant treatment for cerebral thrombolysis

**Thavarak Ouk, Sophie Gautier*, David Montaigne*, Xavier Maréchal, Olivier Pétrault,
Maud Laprais, Michèle Bastide, Rémi Nevière, Jacques Caron, Régis Bordet**

En préparation

The PPAR-alpha activator fenofibrate as a potential adjuvant treatment for cerebral thrombolysis

Thavarak Ouk, Sophie Gautier*, David Montaigne*, Xavier Maréchal, Olivier Pétrault, Maud Laprais, Michèle Bastide, Rémi Nevière, Jacques Caron, Régis Bordet

Administration of fenofibrate (a nuclear peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha agonist) resulted in neural and vascular protection and a concomitant decrease in the risk of haemorrhage associated to thrombolysis with tissue plasminogen activator in a model of focal ischemic stroke. Mechanisms involve the microglia and interactions between polynuclear neutrophils and the vessel wall. Our results suggest that fenofibrate should be clinically trialled as a potential adjuvant treatment for cerebral thrombolysis.

Despite its very narrow therapeutic window, thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator (t-PA) remains the only acute-phase treatment for ischaemic stroke¹. However, the risk of haemorrhage associated with late t-PA administration has prompted efforts to characterize adjuvant drug treatments capable of reducing this risk and/or broadening the therapeutic window for thrombolysis². The haemorrhagic complications of thrombolysis result from a rupture of the blood-brain barrier which involves t-PA's harmful effects within the neurovascular unit^{3,4} and activation under the combined effects of ischaemia and thrombolysis of both microglial cells and circulating polynuclear neutrophils (PMN), resulting in a greater release of free radicals, cytokines and proteases (particularly metalloproteinase-9 (MMP-9))⁵⁻⁹. The ideal strategy for complementing thrombolysis would involve dual neural and vascular protection of the neurovascular unit¹⁰. Given the pleiotropic effects of nuclear receptor PPAR-alpha on inflammatory phenomena, cytokine release, vascular adhesion proteins and microglial activation^{11,12}, we hypothesized that activation of

PPAR-alpha by fenofibrate (a widely used lipid-lowering drug) would decrease the haemorrhagic risk following thrombolysis with rt-PA by (i) protecting both the brain tissue and the cerebral blood vessels, (ii) decreasing microglial activation and (iii) inhibiting the activation of neutrophils and the latter's interaction with the endothelium.

In a first step, we evaluated the neuroprotective effect of acute fenofibrate administration (50 mg/kg, b.i.d, over 72 hours) in transient (60-minute) middle cerebral artery occlusion (MCAO) models of focal ischaemia-reperfusion in the rat and the mouse ^{11,13} by histologically quantifying the infarct volume (**Fig 1a**). Fenofibrate administration produced a significant reduction in the total infarct volume (a 43% reduction in the mouse ($p<0.05$; **Fig 1b**) and a 29 % reduction in the rat ($p<0.05$; **Fig 1c**)). The effect was exclusively cortical and thus did not change the striatal infarct volume. In parallel, fenofibrate administration helped to decrease the functional impairment induced by ischaemia/reperfusion, as determined by the rotarod test (**Fig 1d**). This decrease in infarct size was also associated with a reduction in the endothelial functional changes, studied *in vitro* (isolated MCA on Halpern arteriograph) or *in vivo* (cortical pial arteries on videomicroscopy) as markers of the vascular impact of MCAO (**supplementary methods**)^{13,14}. *In vitro*, the endothelium-dependent vasodilatory response induced by acetylcholine (following pre-contraction with 10^{-6} M serotonin) was significantly altered 72 hours after the induction of ischaemia (in comparison with isolated MCA from sham-treated rats) whereas the endothelium-independant response to sodium nitroprusside remained normal. A treatment with fenofibrate preserved from the post-ischaemic alteration of the endothelium-dependant response (**Fig 1e**). *In vivo*, the vasodilatory response of the cortical pial arteries (which are supplied by the MCA) to acetylcholine (after pre-contraction with serotonin) fell by 48 % in untreated mice; this reduction was prevented by fenofibrate administration (**Fig 1f**). In line with the known role of leukocytes in post-ischaemia vascular alterations¹⁵, fenofibrate prevents leukocyte rolling and adhesion to the vessel wall in the

aftermath of cerebral ischaemia, with a peak 24 hours after onset (**Fig 1g**). This decrease in leukocyte rolling and adhesion results in decreased infiltration of the ischaemic focus by PMN, as evidenced by a reduction in myeloperoxidase expression in the ischaemic zone in fenofibrate-treated rats when compared with untreated, ischaemic rats (**Fig 1h**). This can be explained by the fact that fenofibrate prevents the post-ischaemic increase in expression of the ICAM-1 vascular adhesion protein (**Fig 1i**) within the ischaemic area. The drug also decreases expression of the Ox-42 (marker in the ischaemic area) suggesting prevention of microglial activation, which is otherwise a source of neutrophil chemoattractants (**Fig 1j**).

Observation of fenofibrate's vascular effects prompted us to investigate whether administration of the drug could prevent the occurrence of haemorrhagic complications in a spontaneously hypertensive rat model (**Fig 2a**) that we have described previously³ (**supplementary methods**). In this model, infusion of a thrombolysis solution 6 hours after the onset of ischaemia triggers a significant increase in haemorrhagic lesions, as evidenced by petechiae (**Fig 2b**) and aggravates the post-ischaemic endothelial dysfunction of the MCA (**Fig 2c**). Fenofibrate administration within 72 hours of the onset of ischaemia (50 mg/kg b.i.d) significantly reduced the number of petechiae resulting from administration of the thrombolysis solution (**Fig 2d**). In parallel, fenofibrate prevented endothelial dysfunction, as attested by a significantly greater vasodilatory response for the MCA of fenofibrate-treated rats than in sham-treated animals (**Fig 2b**). Fenofibrate also induced a decrease in cortical and striatal infarct size (**Fig 2e**). On the cellular level, fenofibrate's preventive effect on the tPA-induced haemorrhagic complications was accompanied by a decrease in microglial activation, as witnessed by decreased Ox42 expression (**Fig 2g**), inhibition of leukocyte-endothelium interactions, as witnessed by decreased ICAM-1 expression (**Fig 2h**) and decreased neutrophil infiltration into the ischaemic area, as evidenced by a reduction in myeloperoxidase expression (**Fig 2i**).

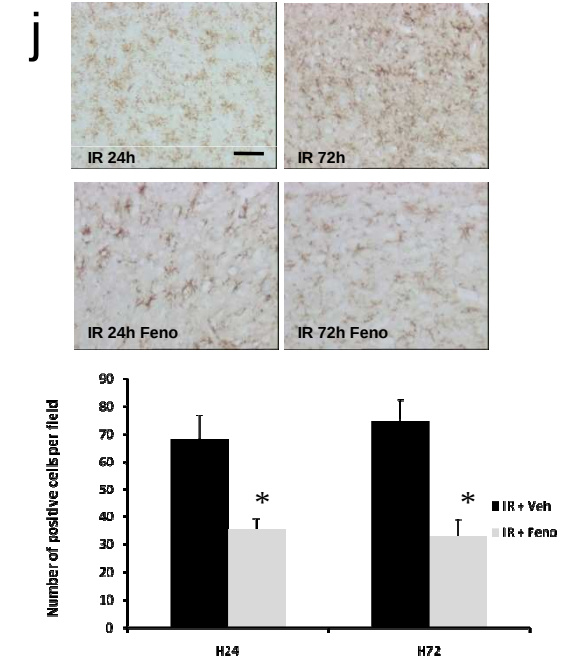
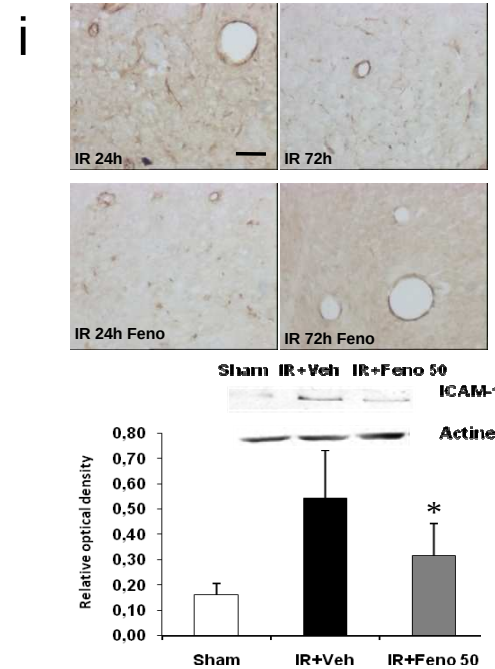
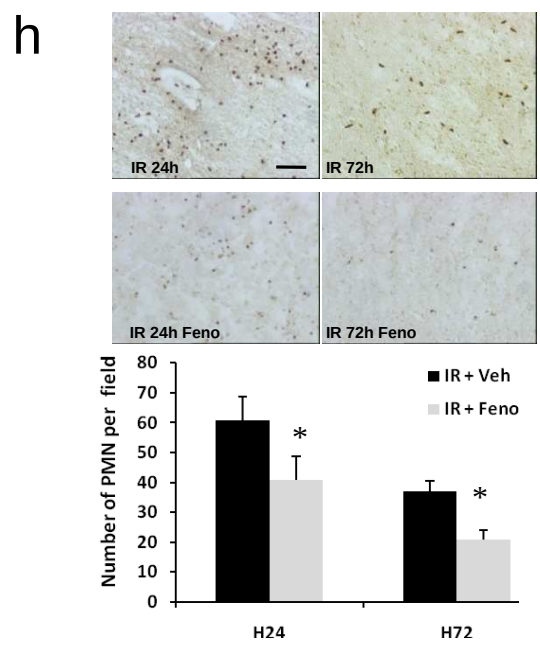
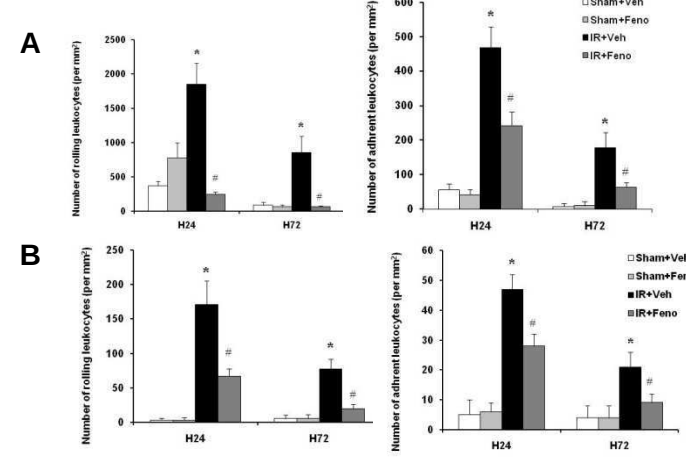
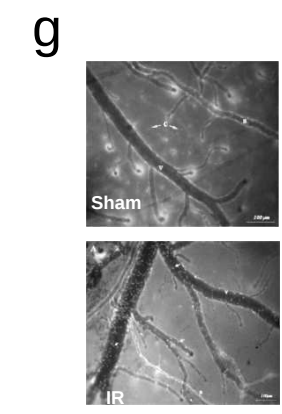
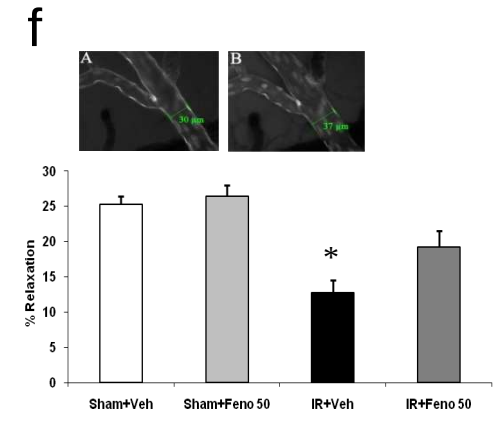
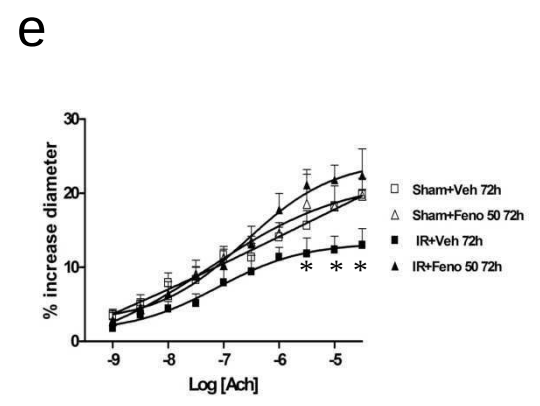
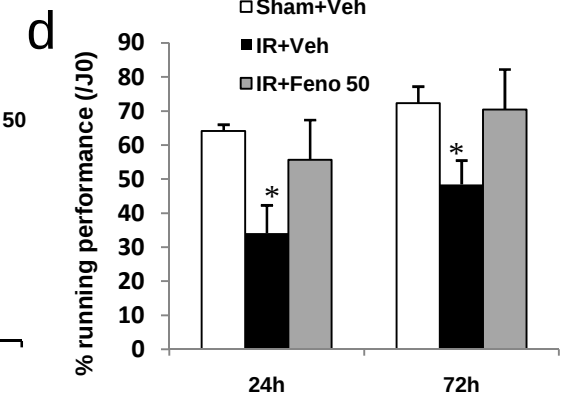
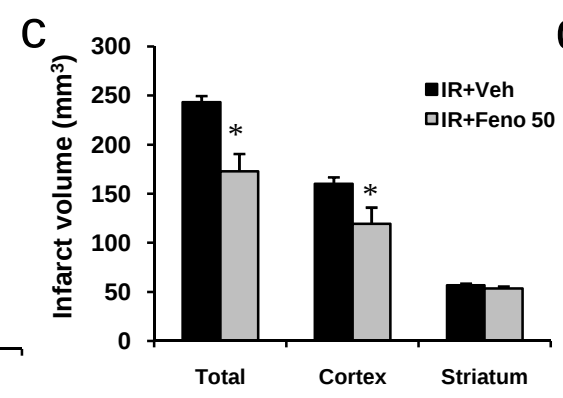
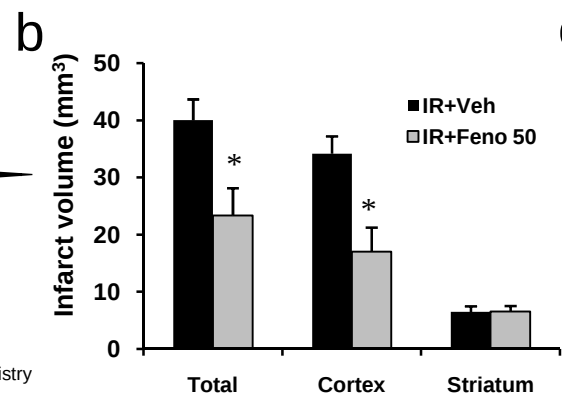
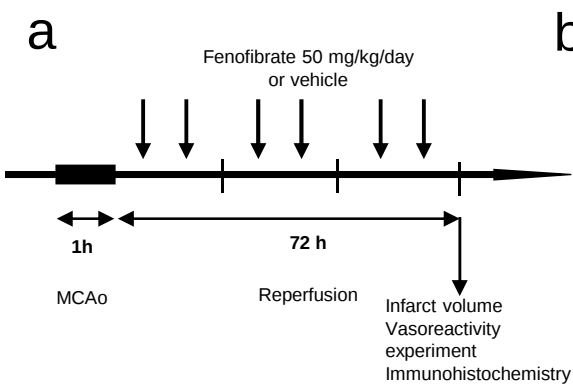
These results provide the first insight into a beneficial effect of the PPAR-alpha agonist fenofibrate when administered during the acute phase of experimentally induced cerebral ischaemia and highlight a dual neuroprotective and vasculoprotective mechanism - the value of which has been recently emphasized^{5,10}. Fenofibrate's mode of action reveals the importance of the polynuclear neutrophil in these neuroprotective and vasculoprotective effects, by virtue of the cell's involvement in post-ischaemic inflammatory phenomena and vessel wall alterations. Fenofibrate's protective action makes it a candidate adjuvant treatment for fibrinolysis, since we have demonstrated that the drug reduces thrombolysis-induced haemorrhagic complications via effects on both components of the neurovascular unit in agreement with current physiopathological hypotheses^{3,5,7,10}. Since fenofibrate (like other synthetic PPAR-alpha agonists) is already registered as a therapeutic, these experimental results justify the implementation of a clinical trial looking at the drug's potential effects on reducing haemorrhagic complications after thrombolysis and broadening the latter's therapeutic window.

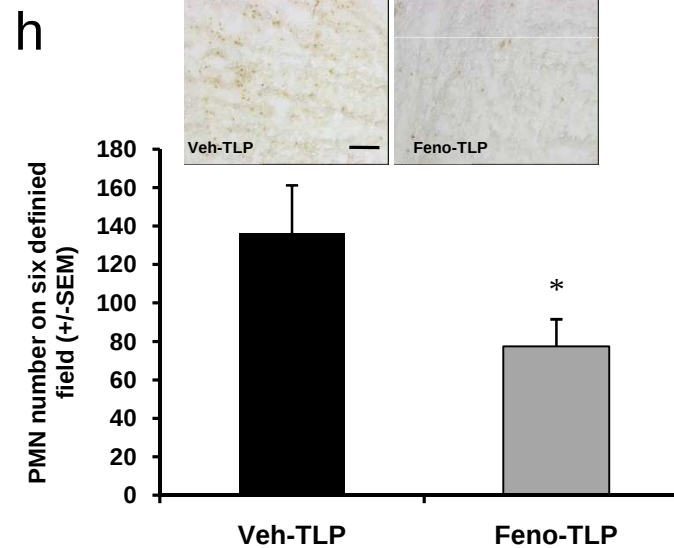
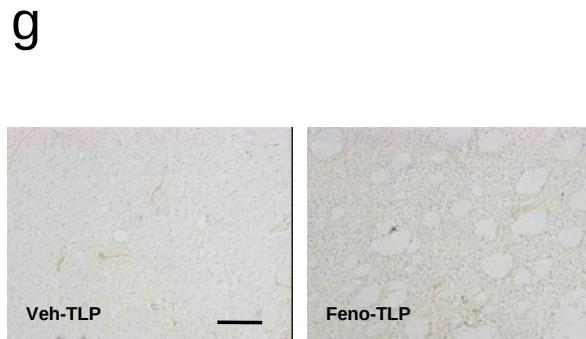
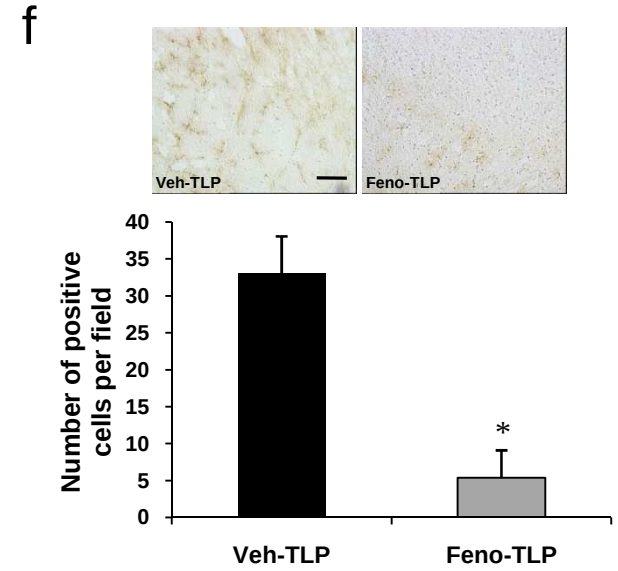
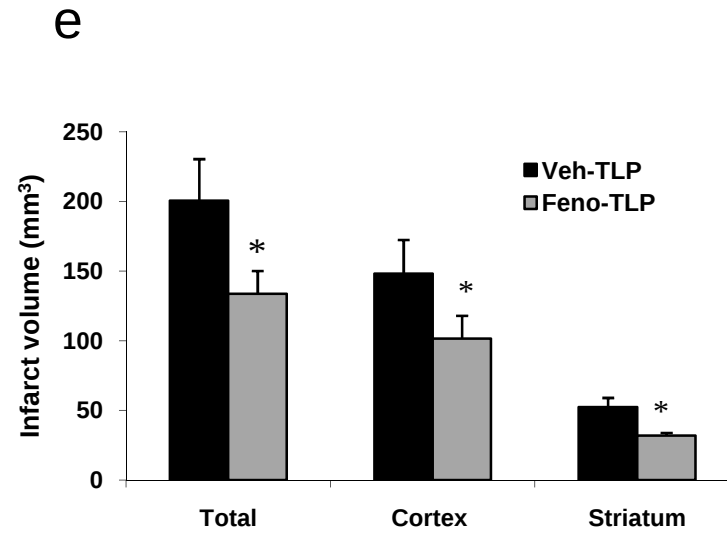
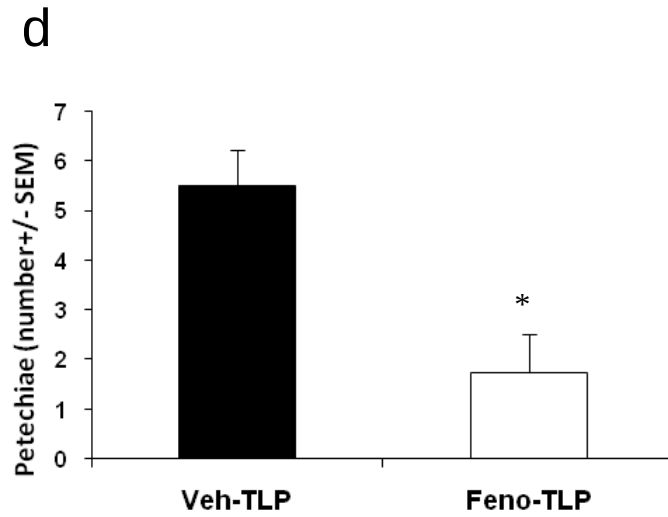
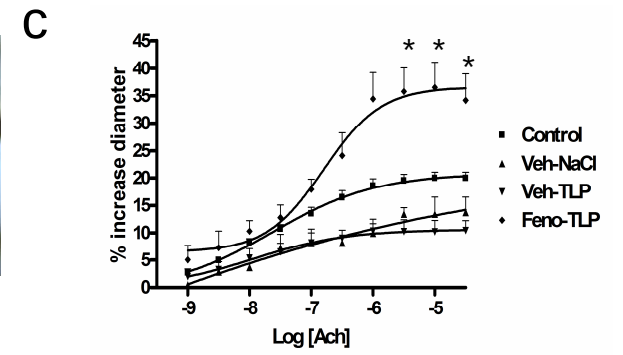
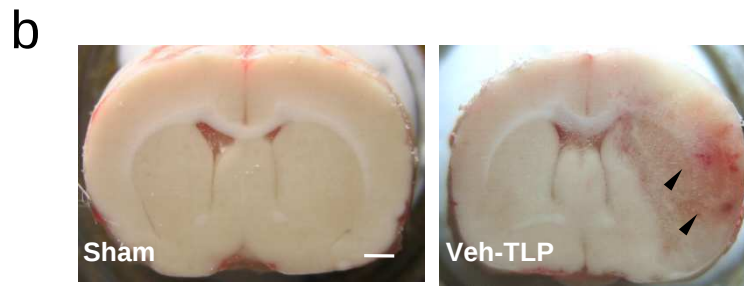
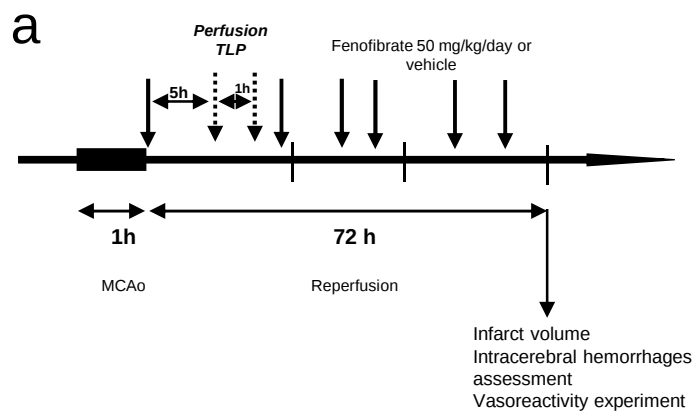
References

1. Hacke, W. et al. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1317-1329 (2008).
2. Maier, C.M., Hsieh, L., Crandall, T., Narasimhan, P., Chan, P.H. *Ann. Neurol.* **59**, 929-38 (2006).
3. Gautier, S. et al. *Stroke* **34**, 2975-9 (2003).
4. Kahles, T. et al. *Vascul. Pharmacol.* **43**, 254-9 (2005).
5. del Zoppo, G.J. *N. Engl. J. Med.* **354**, 553-5 (2006).
6. Justicia, C. et al. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 1430-40 (2003).
7. Zhao, B.Q., Tejima, E. & Lo, E.H. *Stroke* **38**, 748-52 (2007).
8. Cuadrado, E. et al. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 207-14 (2008).
9. Gautier, S., Ouk, T., Pétrault, O., Caron, J., Bordet, R. *Br J. Pharmacol.* in press (2009).
10. Lo, E.H., Broderick, J.P. & Moskowitz, M.A. *Stroke* **35**, 354-6 (2004).
11. Deplanque, D. et al. *J. Neurosci.* **23**, 6264-71 (2003).
12. Heneka, M.T. & Landreth, G.E. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 1031-45 (2007).
13. Bastide, M. et al. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 399-405 (2003).
14. Neuvière, R. et al. *Crit Care Med.* **28**, 1072-6 (2000)
15. Pétrault, O. et al. *Br. J. Pharmacol.* **144**, 1051-8 (2005).

Figure 1: Effects of administering the PPAR-alpha agonist fenofibrate during the acute phase of cerebral ischemia in an intraluminal occlusion model in the rat and in the mouse. Values are means $\pm$ SEM. Statistical comparisons were made using an analysis of variance (ANOVA) and protected least significant difference (PLSD) Fisher *post hoc* tests for pairwise comparisons **(a)** Design of the experimental protocol. Fenofibrate (50mg/kg) or vehicle was administered by twice-daily gavage over the 72 hours following the ischemia. **(b)** The total and cortical infarction volumes determined 72 hours after the induction of ischemia were significantly ($*p<0.05$) lower in fenofibrate-treated mice ($n= 12-13$ mice) than in control mice and significantly lower in fenofibrate-treated rats **(c)** ($n= 10$ per group rats) than in control rats. **(d)** The post-ischemia functional impairment (as evaluated in the rotarod test) was smaller in fenofibrate-treated rats ($n= 8-11$ rats) than in ischemic animals ($*p<0.05$ compared to sham value). **(e)** *In vitro*, the application of increasing concentrations of acetylcholine (Ach) to the middle cerebral artery led to endothelium-dependant relaxation, which was impaired in the aftermath of ischemia/reperfusion (I/R) ($*p<0.05$ compared to sham value). This dysfunction was abolished in fenofibrate-treated rats ($n= 5$ rats per group), compared with ischemic animals. **(f)** *In vivo*, acetylcholine-induced, endothelium-dependant relaxation was determined by videomicroscopy of the murine pial arteries (A: absence of Ach; B: presence of Ach). The dysfunction in relaxation usually seen under ischaemic conditions was abolished by fenofibrate treatment ($n= 8$ mice per group), compared with controls ($*p<0.01$ compared to sham value; $\#p<0.05$ compared to ischemia-reperfusion value). **(g)** In murine arterioles (A) and venules (B), fenofibrate treatment decreased leukocyte rolling and adhesion ($n= 12$ mice per group). **(h)** Neutrophil infiltration into the infarcted zone (measured quantitatively via the expression of the specific marker myeloperoxidase) was decreased by fenofibrate treatment in the rat ($n= 5$ rats per group), compared with ischemic animals ($*p<0.05$). Scale bar : 100 μm **(i)** Quantitative evaluation of the ICAM-1 leukocyte adhesion protein (using immunohistochemistry and western blotting) revealed a significant decrease ($*p<0.05$) in the expression of this protein during fenofibrate treatment ($n= 4$ rats per group), compared with ischemic animals. Scale bar : 100 μm **(j)** Immunohistochemical quantification of the expression of Ox-42 (a marker of microglial activation) revealed a significant decrease ($*p<0.05$) in this parameter after fenofibrate treatment in the rat ($n= 5$ rats per group), compared with ischemic animals. Scale bar : 25 μm .

Figure 2: Evaluation 72 hours after the induction of cerebral ischemia of the effects of acute-phase administration of the PPAR- α agonist fenofibrate in a mechanical thrombolysis-related brain bleeding model in the rat. Values are means $\pm$ SEM. Statistical comparisons were performed using an analysis of variance (ANOVA) and protected least significant difference (PLSD) Fisher *post hoc* tests for pairwise comparisons (a) Design of the experimental protocol. Fenofibrate (50mg/kg) or vehicle was administered to thrombolysed rats by twice-daily gavage over 72 hours. (b) tPA thrombolysis 6 hours after the onset of ischemia resulted in histologically visible haemorrhage. Scale bar: 500 μ m. (c) The application of increasing doses of acetylcholine led to endothelium-dependent relaxation, which was altered by ischemia/thrombolysis. However, the post-ischemia dysfunction in relaxation is prevented by acute treatment with fenofibrate, compared with ischemic animals (n= 5 and n= 6, respectively) (*p<0.01). (d) Blinded, histological evaluation of the number of petechiae revealed a significant decrease (*p<0.05) in the haemorrhagic risk when fenofibrate had been administered (n= 9-11 rats), compared with controls. (e) The total, cortical and striatal infarction volumes were clearly lower in fenofibrate-treated rats (n= 8-10 rats), compared with the ischemic animals (*p<0.05). (f) Expression of Ox-42 (a marker of microglial activation) was lowered by fenofibrate treatment (n= 4 rats per group), compared with ischemic animals (*p<0.05); scale bar : 25 μ m, as was that of the ICAM-1 adhesion protein (g), a marker of leukocyte/endothelium interactions (n= 3 rats per group; *p<0.05), compared with ischemic animals. Scale bar : 100 μ m (h) Neutrophil infiltration into the infarct area was quantified by counting the anti-myeloperoxidase-positive cells on six adjacent 1mm² fields within an ischemic zone. (n= 5 rats per group). *p<0.05 vs. vehicle. Scale bar: 100 μ m.





DISCUSSION

En déplétant ou en inactivant les polynucléaires neutrophiles, nous avons démontré dans un modèle d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne qu'ils participaient aux altérations post-ischémiques cérébrales et vasculaires. En effet, nous observions une double protection du tissu parenchymateux et de l'endothélium. Les polynucléaires neutrophiles jouaient également un rôle important dans le risque hémorragique de la thrombolyse comme en témoignent nos résultats dans un modèle de complications hémorragiques induites par le rt-PA. La déplétion ou l'inactivation des polynucléaires neutrophiles entraînait une diminution du nombre de pétéchies parallèlement à une prévention des altérations vasculaires post-ischémiques.

Compte-tenu du rôle des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et des complications hémorragiques, nous avons stimulé la lignée granulocytaire par l'administration d'un facteur de croissance, le G-CSF, dans les deux modèles d'études. Le G-CSF présentait des propriétés neuroprotectrices mais n'avait pas d'effet protecteur sur l'endothélium vasculaire. Le G-CSF entraînait même une altération de la relaxation endothélium-dépendante en condition ischémique ainsi qu'en condition sham, par le biais de son action sur les polynucléaires neutrophiles. En dépit d'une diminution du volume d'infarctus et de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le tissu ischémié, le G-CSF aggravait le nombre de pétéchies, conduisant à l'apparition d'hématomes chez certains animaux.

Nous nous sommes ensuite intéressés à une modulation indirecte sur les polynucléaires neutrophiles en inhibant leur interaction avec la paroi vasculaire via l'activation des récepteurs nucléaires PPAR- α . En traitement préventif, l'activation des récepteurs nucléaires PPAR- α par le fénofibrate de manière directe ou par l'atorvastatine de manière indirecte permettait une diminution du volume d'infarctus ainsi qu'une préservation de la fonction endothéliale. Ces effets protecteurs étaient associés à une diminution de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles, suggérant une prévention des interactions leucocyte-endothélium. Dans le cas du traitement par fénofibrate, son interruption 3 jours avant la réalisation de l'ischémie entraînait une perte partielle de neuroprotection et une aggravation de la dysfonction endothéliale malgré une conservation de l'effet anti-inflammatoire du fénofibrate, qui pourrait faire penser que l'effet préventif était en partie dû à un effet aigu, lié à la présence des agents pharmacologiques dans l'organisme au moment de l'induction de l'ischémie. Nous avons donc étudié l'effet de l'activation des récepteurs nucléaires PPAR- α en traitement curatif aigu. Un traitement par fénofibrate ou par atorvastatine prévenait des altérations post-ischémiques cérébrales et vasculaires. Ces effets étaient accompagnés d'une moindre infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le tissu ischémié. Dans le modèle de complications hémorragiques induites par

le rt-PA, l'administration de fénofibrate au décours de l'ischémie, permettait de réduire le nombre de pétéchies parallèlement à une neuroprotection et une vasculoprotection. On observait également une prévention de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles et de l'activation microgliale.

Ces résultats conduisent à discuter deux principaux aspects. Le premier concerne le rôle des interactions leucocyte-endothélium dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et des complications hémorragiques de la thrombolyse, en axant la discussion sur le polynucléaire neutrophile qui semble jouer un rôle essentiel. Le rôle des interactions leucocyte-endothélium met également en exergue la contribution des altérations endothéliales au cours de l'ischémie, donnant corps aux théories mettant en avant la nécessité d'une modulation de l'unité neurovasculaire pour induire une neuroprotection et une vasculoprotection, dans le cadre d'une protection globale. Le deuxième aspect à discuter est l'exemple de la modulation pharmacologique d'une cible, le PPAR- α , exprimée par les différents compartiments de l'unité neurovasculaire. Dans cette deuxième partie de la discussion, sera particulièrement argumentée l'inhibition, par deux types d'agents hypolipémiants, de l'inflammation tant à l'échelon parenchymateux que vasculaire, qui permet à la fois une protection préventive et une protection aiguë. Dans une troisième partie, nous mettrons en lumière que ces données expérimentales peuvent expliquer des données cliniques ou servir de rationnel à des études translationnelles.

I. Rôle des interactions leucocyte-endothélium et ischémie cérébrale

I.A. Le polynucléaire neutrophile : un médiateur des conséquences neurovasculaires de l'ischémie ?

Les données de la littérature concernant le rôle du polynucléaire neutrophile dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale sont abondantes. Plusieurs approches ont été utilisées pour déterminer leur implication dans les lésions post-ischémiques : (i) en déplétant les leucocytes (pharmacologiquement ou génétiquement) (ii) en interférant avec les interactions leucocytes et protéines d'adhésion vasculaire (génétiquement ou par immuno-neutralisation). L'utilisation d'anticorps anti-neutrophiles (Chen et al, 1992 ; Connolly et al, 1996 ; Matsuo et al,

1994 ; Shimakura et al, 2000) ou d'agents pharmacologiques neutropénisants tel que la vinblastine (Beray-Berthet et al 2003) permettaient d'obtenir une diminution du volume d'infarctus. Ces résultats étaient retrouvés en administrant des anticorps anti-ICAM-1 (Chopp et al, 1996 ; Matsuo et al, 1994 ; Zhang et al, 1995) ou anti-CD11/CD 18 (Chen et al, 1994) qui interfèrent avec le recrutement leucocytaire dans les modèles d'ischémie transitoire. L'emploi d'animaux transgéniques déficients en CD 18 ou ICAM-1 (Prestigiacomo et al, 1999) entraînait également une diminution des lésions ischémiques. Nos travaux confirment l'implication des polynucléaires neutrophiles dans les effets délétères sur le parenchyme cérébral comme le montre l'effet neuroprotecteur observé en déplétant ou en inactivant les polynucléaires neutrophiles, mais nous démontrons, pour la première fois, qu'au delà de l'atteinte parenchymateuse, le polynucléaire neutrophile est également impliqué dans les altérations endothéliales post-ischémiques.

La neutropénie induite pharmacologiquement ou l'inactivation des polynucléaires neutrophiles prévenait les altérations de la paroi vasculaire observées au décours du processus ischémique. Différents travaux ont déjà suggéré que les polynucléaires neutrophiles pouvaient directement modifier le potentiel relaxant de l'endothélium. L'activation des neutrophiles par une injection d'ester de phorbol, induit une perte de la relaxation endothéliale sans affecter la relaxation endothélium-indépendante (Akopov et al, 1994). L'origine de la dysfonction endothéliale post-ischémique pourrait par conséquent être liée à la présence des neutrophiles circulants. Par leurs interactions avec les molécules d'adhésions et leur activation, les polynucléaires neutrophiles participent à la formation d'un stress oxydant secondaire *via* l'anion superoxyde produit par la NADH oxydase et l'acide hypochloreux par les myéloperoxydases. Puis la biodisponibilité du NO est probablement diminuée à cause de sa combinaison avec l'anion superoxyde pour former le peroxynitrite délétère. Par ailleurs, les polynucléaires neutrophiles secrètent des MMP-9 (Justicia et al, 2003 ; Gidday et al, 2005), qui favorisent l'extension de l'œdème et des lésions tissulaires post-ischémiques mais altèrent également la lame basale des artères cérébrales (Del Zoppo et Mabuchi, 2003).

I.B. Rôle du polynucléaire dans la physiopathologie des complications hémorragiques de la thrombolyse

L'évocation de la paroi vasculaire comme cible pertinente pour protéger des complications post-ischémiques est retrouvée dans la littérature (Fagan et al, 2004) et de plus en

plus, elle apparaît comme incontournable dans les futures prises en charge des AVC. Compte-tenu de la protection vasculaire induite par la déplétion en polynucléaires neutrophiles, nous avons également étudié la part de ces cellules inflammatoires dans le risque hémorragique induite par la thrombolyse. Nous avons démontré que les polynucléaires neutrophiles étaient impliqués dans la physiopathologie des complications hémorragiques. En effet, l'administration de vinblastine ou d'un anticorps monoclonal prévenait la survenue de complications hémorragiques en parallèle d'une protection similaire de la fonction endothéliale. Cependant la déplétion spécifique des polynucléaires neutrophiles par l'anticorps mAbRP3 n'induisait pas de protection cérébrale au même titre que la vinblastine. Cette différence d'effet au niveau cérébral peut s'expliquer également par l'absence de spécificité de la vinblastine sur les cellules sanguines et notamment les plaquettes. Nous observons ainsi qu'il peut exister une discordance entre le risque hémorragique induite par la thrombolyse et la sévérité de l'infarctus cérébral. Cependant nous démontrons qu'il existe un lien étroit entre les lésions vasculaires et les hémorragies intracérébrale induites par la thrombolyse via les interactions leucocytes-endothélium.

Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer les effets délétères observés via les interactions existant entre les polynucléaires neutrophiles, paroi vasculaire et t-PA. Le rôle de la plasmine, résultant de la lyse du caillot avec le t-PA, a déjà été décrit dans la physiopathologie des complications hémorragiques. En effet, la plasmine est capable d'activer les leucocytes, entraîne la rupture de la BHE et augmente la perméabilité vasculaire (Montrucchio et al, 1996 ; Xue and Del Bigio, 2001). De plus, les polynucléaires neutrophiles sont responsables de l'activation et de la libération de métalloprotéinases au cours de l'ischémie cérébrale (Asahi et al, 2000 ; Justicia et al, 2003 ; Gidday et al, 2005). Il est bien prouvé que ces protéases aggravaient le volume d'infarctus et contribuait au risque hémorragique de la thrombolyse (Aoki et al, 2002 ; Sumii and Lo, 2002 ; Castellanos et al, 2003 ; Gidday et al, 2005). Les polynucléaires neutrophiles semblent également être la source principale de MMP-9 dans la zone d'hémorragies et tout particulièrement autour des vaisseaux (Rossell et al, 2008). Il a été démontré que le t-PA stimulait directement la libération de MMP-9 en dégranulant les neutrophiles (Cuadrado et al, 2008).

En raison donc de l'implication des polynucléaires neutrophiles dans la survenue des complications hémorragiques induites par le t-PA, nous avons étudié si une activation de la lignée granulocytaire par le G-CSF avait une incidence sur le risque hémorragique. Dans nos modèles, l'effet neuroprotecteur du G-CSF est bien présent et en bonne concordance avec les

données de la littérature (Minnerup, 2008). En revanche, cet effet neuroprotecteur n'a pas de conséquences sur le risque hémorragique de la thrombolyse, aggravé lors du traitement par G-CSF. Ces résultats suggèrent donc que si le contexte ischémique est nécessaire, ce n'est probablement pas les lésions au niveau du parenchyme seul, mais bien les lésions au niveau de l'unité neurovasculaire, qui sont impliquées.

En ce sens, nous démontrons pour la première fois que l'administration de G-CSF a des conséquences délétères sur le vaisseau, et en particulier sur la relaxation endothélium-dépendante de l'artère cérébrale moyenne. En dehors de toute condition ischémique, le G-CSF induit une altération de la fonction endothéliale comparable à celle induite par le processus d'ischémie/reperfusion cérébrale. En condition ischémique, l'effet vasculaire du G-CSF aggrave la dysfonction endothéliale post-ischémique dans le modèle de MCAO, aggravation que l'on ne retrouve pas dans le modèle de complications hémorragiques, probablement en raison d'une dysfonction endothéliale déjà plus sévère après ischémie/reperfusion et thrombolyse (Gautier et al, 2003). L'aggravation du risque hémorragique de la thrombolyse en parallèle de cette dysfonction endothéliale est en faveur d'une part vasculaire importante dans les mécanismes en jeu dans la survenue des complications hémorragiques après la thrombolyse. Cependant, nos résultats ne montrent pas de parallélisme entre l'aggravation du risque hémorragique et l'infiltration des polynucléaires dans la zone infarctée, puisque celle-ci est diminuée en cas de traitement par G-CSF. Si le G-CSF permet de prévenir l'infiltration du parenchyme ischémié par les polynucléaires neutrophiles rendant compte de l'effet neuroprotecteur (Park et al, 2005), l'effet de prolifération des polynucléaires neutrophiles pourrait expliquer les effets délétères vasculaires. Nous émettons donc l'hypothèse d'un rôle des polynucléaires dans le risque hémorragique non pas par les lésions inflammatoires qu'ils induisent en zone infarctée, mais bien par les conséquences de leur activation au niveau vasculaire.

I.C. Dysfonction endothéliale : acteur ou marqueur ?

Ces résultats sur l'implication du polynucléaire neutrophile dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et des complications hémorragiques nous amènent à discuter de la part de la dysfonction endothéliale. Au de l'ischémie myocardique, cette même problématique a été soulevé (Laude et al, 2001) dans la mesure où l'infarctus du myocarde n'est pas simplement une pathologie du cardiomyocyte. Si la dysfonction endothéliale coronaire post-ischémique a été considéré comme une cible thérapeutique, cette conception a été secondairement remise en question et la dysfonction endothéliale post-ischémique est maintenant plus considérée comme

un marqueur de phénomènes plus généraux. Il pourrait en être de même au cours de l'ischémie cérébrale. Néanmoins dans nos différents modèles, un effet neuroprotecteur ne s'accompagnait pas systématiquement d'une prévention de la dysfonction endothéliale comme le montre nos résultats lorsqu'on activait la lignée granulocytaire. Ceci est d'ailleurs retrouvé avec d'autres approches pharmacologiques ciblant notamment le stress oxydant, voie physiopathologique également impliquée dans la dysfonction endothéliale. L'administration de la chalcone, un anti-oxydant, à la phase aiguë de l'ischémie entraînait une diminution du volume d'infarctus sans protection de la fonction endothéliale (Pétrault et al, 2004). De même qu'au décours du temps, on observe que la taille du volume d'infarctus tend à diminuer, témoin d'une plasticité cérébrale, sans pour autant avoir une récupération de la fonction endothéliale (article N°6). Dans ce contexte, la dysfonction endothéliale peut être assimilée à un index des altérations cérébro-vasculaires. Sa prévention permettrait certes une protection optimale du tissu cérébral mais les anomalies de la réactivité vasculaire ne semblent peut-être pas être le principal acteur de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. En ce sens, la dysfonction endothéliale pourrait être le simple reflet des conséquences délétères qu'exercerait le polynucléaire neutrophile à l'interface sang/vaisseau.

II. Les récepteurs nucléaires PPAR- α

II.A. Hypolipémiants, récepteurs PPAR et protection cérébrale

II.A.1. Neuroprotection préventive

En raison de son expression au niveau neuronal, astrocytaire, endothéliale et musculaire lisse, PPAR- α exerce des effets pléiotropes et constitue une cible pharmacologique intéressante afin d'interagir avec plusieurs voies physiopathologiques de l'ischémie au sein de l'unité neurovasculaire.

L'administration de fénofibrate pendant 14 jours chez le rat avant la réalisation de l'ischémie entraîne une diminution du volume d'infarctus et prévient la dysfonction endothéliale post-ischémique. Nous confirmons l'effet neuroprotecteur déjà observé chez la souris. La neuroprotection semble bien passer par les récepteurs PPAR- α puisqu'elle n'est plus présente chez les souris KO PPAR- α (Deplanque et al, 2003). Elle est par ailleurs indépendante de l'action hypolipémiante du fénofibrate. Plusieurs mécanismes pouvaient expliquer les effets neuroprotecteurs de la modulation des PPAR- α au cours de l'ischémie cérébrale. D'une part, au niveau des voies du stress oxydant, le fénofibrate augmentait l'expression des enzymes anti-

oxydantes tels que la Cu-Zn superoxyde dismutase ainsi que les enzymes dépendants du glutathion. D'autre part, le fénofibrate exerçait ses effets anti-inflammatoires en inhibant l'expression des protéines d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1. Cet effet neuroprotecteur était également retrouvé avec l'utilisation d'un agoniste plus spécifique des récepteurs nucléaires PPAR- α , le WY 14643. La neuroprotection s'accompagnait d'une diminution de la formation des radicaux libres oxygénés, de la NOS inductible et de l'expression d'ICAM-1 (Collino et al, 2006).

Les effets des hypolipémiants, agissant selon toute vraisemblance via les récepteurs nucléaires PPAR- α s'apparent à ceux observés avec les glitazones qui activent les récepteurs PPAR- γ . En effet, l'administration de pioglitazone (Shimazu et al, 2005 ; Zhao et al, 2005 ; Zhao et al, 2006), rosiglitazone (Chu et al, 2006) préalablement à la réalisation de l'ischémie prévenait des altérations cérébrales post-ischémiques. Les voies par lesquelles l'activation des récepteurs PPAR- γ exerce une protection cérébrale sont identiques à celles observées avec les récepteurs nucléaires PPAR- α : stress oxydant (augmentation de la Cu-Zn superoxyde dismutase) et inflammation (diminution de l'activation microgliale, de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles, de la NOS inductible, de la COX 2) (Culman et al, 2007 ; Yi et al, 2007).

Au même titre que le fénofibrate, nous avons évalué l'effet d'un autre hypolipémiant, l'atorvastatine en traitement préventif de l'ischémie cérébrale. L'atorvastatine administrée à deux doses différentes 10 et 20 mg/kg/jour pendant 14 jours préalablement à la réalisation de l'ischémie diminuait de manière dose-dépendante le volume d'infarctus. Ces résultats confirment ceux retrouvés dans la littérature. De nombreuses études expérimentales ont montré les effets bénéfiques des statines. Ces effets passaient entre autre par une augmentation de l'expression de la NOS endothéliale au niveau vasculaire et des plaquettes, une diminution des marqueurs d'activation des plaquettes, une augmentation du flux sanguin cérébral (Endres et al, 1998 ; Gertz et al, 2003). Parallèlement à ces effets neuroprotecteurs que nous avons observé, l'atorvastatine à la dose de 20 mg/kg permettait de prévenir la dysfonction endothéliale post-ischémique. Ces résultats laissent à penser comme précédemment que pour obtenir une prévention optimale de l'ischémie cérébrale, une protection des deux compartiments neuro-glial et vasculaire est nécessaire. De plus l'effet de l'atorvastatine passerait de manière indirecte par l'activation des récepteurs nucléaires PPAR- α comme en témoigne la perte de neuroprotection observée chez des souris PPAR- α KO traitées par l'atorvastatine. Ces effets des statines médiés par les récepteurs nucléaires PPAR- α ont déjà été évoqués (Paumelle et Staels, 2008).

II.A.2. Neuroprotection préventive par le fénofibrate : Préconditionnement ou effet aigu ?

Pour déterminer si l'effet préventif du fénofibrate pouvait s'apparenter à un preconditionnement ischémique à l'instar de ce qui était observé avec le lipopolysaccharide bactérien, nous avons interrompu le traitement par fénofibrate 3 jours avant l'induction de l'ischémie. Cette interruption entraînait une perte de neuroprotection en comparaison des animaux traités pendant 14 jours mais une neuroprotection toujours significative par rapport aux animaux non traités. De plus on observait une aggravation de la dysfonction endothéliale post-ischémique. Ces résultats suggèrent qu'une double protection de la paroi vasculaire et du tissu parenchymateux est nécessaire pour obtenir une neuroprotection optimale. Il existe néanmoins deux composantes à la protection induite par le fénofibrate. Une part parenchymateuse, malgré l'interruption du traitement par le fénofibrate avant l'ischémie, on observait toujours une neuroprotection qui pourrait donc correspondre un phénomène de preconditionnement ischémique. A l'inverse, pour ce qui est du versant vasculaire, en raison de l'aggravation de la dysfonction endothéliale consécutive à l'arrêt du traitement, nous serions davantage en faveur d'un effet aigu du fénofibrate sur la fonction endothéliale. Ces résultats s'apparentent à ceux observés avec les statines (Gertz et al, 2003) bien que la perte de neuroprotection était totale. L'aggravation de la dysfonction endothéliale post-ischémique à l'arrêt du fénofibrate ne passe pas par les interactions leucocytes-endothélium dans la mesure où l'effet sur la protéine ICAM-1 persiste malgré l'arrêt du traitement. Deux autres hypothèses pourraient être avancées. La première met en jeu les mécanismes oxydatifs dans la mesure où leur implication dans la dysfonction endothéliale post-ischémique est bien démontrée. L'autre hypothèse serait une diminution de l'expression de la NOS endothéliale, comme celle observée à l'arrêt des statines, mais qui reste à démontrer. Au-delà du mécanisme, la perte partielle de l'effet protecteur parallèle à la perte totale de la protection vasculaire souligne l'importance d'un effet mixte parenchymateux et vasculaire pour obtenir l'effet maximal du fénofibrate en terme de protection cérébrale, en bonne concordance avec les théories mettant l'unité neurovasculaire au cœur de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale.

II.A.3. Neuroprotection aiguë

Dans le modèle d'ischémie/reperfusion, le fénofibrate à la dose de 50 mg/kg/jour pendant 72 heures après l'induction l'ischémie entraînait une diminution du volume d'infarctus. Dans des travaux précédents, un effet neuroprotecteur du fénofibrate en traitement post-ischémique sur 24 heures n'avait pas été retrouvé (Deplanque et al, 2003). Cependant le

mode d'administration était différent et consistait en deux injections intrapéritonéales à 1 et 6 heures après le début de l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, suggérant d'une part que le fénofibrate nécessitait d'être métabolisé en acide fénofibrique pour être actif et d'autre part que la durée de traitement était peut-être trop courte pour induire une neuroprotection significative.

Au niveau vasculaire, nous avons observé que la modulation des récepteurs PPAR- α par le fénofibrate à 50 mg/kg protégeait l'endothélium vasculaire. On peut expliquer cet effet protecteur vasculaire à la dose de 50 mg/kg par les mêmes mécanismes qu'au niveau neuronal en raison de l'expression endothéliale de PPAR- α . De plus il a été décrit que le fénofibrate en stabilisant l'ARNm de la NOS endothéliale pourrait contribuer à une prévention de la dysfonction endothéliale post-ischémique (Goya et al, 2004).

II.B. Effet sur l'inflammation parenchymateuse et vasculaire

Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'aspect anti-inflammatoire de l'activation des récepteurs nucléaires PPAR- α . L'inflammation est devenue une cible privilégiée dans le traitement de l'ischémie cérébrale. La réponse inflammatoire ne touche pas uniquement le neurone mais concerne l'ensemble de l'unité neurovasculaire : cellules endothéliales et microgliales (Endres et al, 2008).

Parallèlement aux effets protecteurs cérébraux et vasculaires par le fénofibrate observés précédemment, nous avons donc étudié différents aspects de la réponse inflammatoire induite par l'ischémie cérébrale. L'administration de fénofibrate pendant 14 jours avant l'ischémie diminuait l'expression d'ICAM-1, l'infiltration des polynucléaires neutrophiles au sein du tissu ischémié et l'activation microgliale. Ces résultats témoignent de l'effet pléiotrope des récepteurs nucléaires PPAR- α en interagissant sur les différents compartiments de l'unité neurovasculaire : le tissu neuronal, la glie et la paroi vasculaire. Le fénofibrate permettrait de limiter le phénomène inflammatoire en agissant sur les interactions endothélium et polynucléaires neutrophiles comme le montrent la moindre infiltration des polynucléaires neutrophiles parallèlement à la diminution de l'expression d'ICAM-1.

En traitement curatif, nous montrons pour la première fois l'effet du fénofibrate sur différents aspects de la réponse inflammatoire médiée par le polynucléaire neutrophile dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et dans celle des complications hémorragiques. En effet, par microscopie intravitale, nous montrons que l'activation aiguë des récepteurs nucléaires

PPAR- α induisait une prévention du rolling et de l'adhésion leucocytaire au niveau artériolaire et vénulaire. Ces effets étaient associés à une prévention partielle de la dysfonction endothéliale post-ischémique. Parallèlement l'administration du fénofibrate à la phase aiguë de l'ischémie diminuait l'infiltration du tissu ischémié par les polynucléaires neutrophiles, l'activation microgliale dans les deux modèles expérimentaux. Dans le modèle de complications hémorragiques de la thrombolyse, le fénofibrate protégeait des altérations vasculaires post-ischémiques mais réduisait surtout le nombre de complications hémorragiques parallèlement à une prévention de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles et de l'activation microgliale. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'effet bénéfique du fénofibrate sur la diminution du risque hémorragique induite par le rt-PA. In vivo, la reperfusion induite par la lyse du thrombus génère un stress oxydant délétère pour le vaisseau et qui pourrait intervenir dans les complications hémorragiques. Cette hypothèse est confortée par la diminution du risque de complications hémorragiques en cas d'administration d'un piègeur de radicaux libres au moment de la reperfusion par le rtPA (Lapchak et al, 2001; Zhao et al, 2001; Asahi et al, 2000). La diminution du risque serait plus importante lorsque le piègeur de radicaux libres est associé avec un traitement à l'héparine, et associé en plus à une neuroprotection (Zhao et al, 2001). De même la genèse de plasmine et l'activation par le rtPA d'autres systèmes protéolytiques, comme les métalloprotéinases, sont corrélées à une ouverture de la barrière hémato-encéphalique et à un risque majoré de complications hémorragiques (Armao et al, 1997; Fukuda et al, 2004). Le rôle des MMPs est en particulier bien étayé dans la survenue des complications hémorragiques par rupture de la BHE, confirmant ainsi le rôle de la paroi vasculaire (Sumii et Lo, 2002, Aoki 2002). Expérimentalement, l'inhibition de la métalloprotéinase-9 atténue la survenue des hémorragies induites par le rtPA (Lapchak et al, 2000 ; Lapchak et Araujo , 2001, Murata et al, 2008) et en clinique, l'activité plasmatique de la métalloprotéinase 9 est prédictive d'un risque hémorragique au cours de la fibrinolyse (Castellanos et al, 2003; Montaner et al, 2003).

L'inflammation est devenue une cible privilégiée dans le traitement de l'ischémie cérébrale. La réponse inflammatoire ne touche pas uniquement le neurone mais concerne l'ensemble de l'unité neurovasculaire : cellules endothéliales et microgliales (Endres et al, 2008). La microglie et les macrophages activés sont capables de sécréter une grande variété de molécules impliquées dans les phénomènes inflammatoires. Certaines cytokines tels qu'IL-1, IL-6, TNF et TWEAK participeraient à l'extension des lésions ischémiques. De plus, le NO produit par les différentes isoformes de NOS jouent un rôle également important dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. La NOS inductible exprimée dans les leucocytes et les macrophages conduiraient à la production de NO ayant des conséquences délétères notamment

via la formation de peroxynitrite. Au cours de l'ischémie cérébrale, l'inflammation est à relier à la régulation de l'expression de certains gènes et notamment les voies de transduction telles qu'PA-1 et NF- κ B. C'est pour cela que les récepteurs nucléaires PPARs constituent une cible pertinente de neuroprotection et de vasculoprotection. Ils sont en effet exprimés dans le vaisseau à différents niveaux : cellules endothéliales (Bishop-Bailey, 2000 ; Marx et al, 1999 ; Lee et al, 2000), cellules musculaires lisses (Poynter et Daynes, 1998 ; Staels et al, 1998). L'activation des récepteurs nucléaires conduisaient à une diminution de l'expression des protéines d'adhésion ICAM-1 (Cuzzocrea et al, 2004), VCAM-1 (Jackson et al, 1999 ; Marx et al, 1999), à une inhibition de la libération de cytokines pro-inflammatoires tels que IL-6 ou de l'expression de la COX-2 (Staels et al, 1998 ; Delerive et al, 1999). Concernant la microglie, peu d'études se sont intéressés à l'effet de l'activation des récepteurs PPAR- α sur la microglie. Une étude a montré que le gemfibrozil inhibait l'induction de cytokine proinflammatoires, entraînant la libération de NO et l'expression de la NOS inducible par sur des cultures primaires d'astrocytes. La littérature est plus abondante pour les récepteurs nucléaires PPAR- γ . Les effets protecteurs de la pioglitazone (Zhao et al, 2005), de la troglitazone (Sundararajan et al, 2005) passeraient entre autre par une diminution de l'activation de la microglie et des macrophages.

Comme nous l'avons vu précédemment, les récepteurs nucléaires PPAR- α interfèrent avec les voies de libération de cytokines pro-inflammatoires. On peut alors se poser la question du site d'action préférentielle du fénofibrate. Quelques données de la littérature suggèrent que l'inflammation post-ischémique pourraient avoir des conséquences délétères non seulement sur le tissu cérébral mais aussi sur les tissus périphériques. Il a été montré qu'au décours d'une ischémie cérébrale, on pouvait observer une dysfonction endothéliale des artères mésentériques (Martinez-Revelles et al, 2008). La production excessive de radicaux libres et la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-1 β) pourraient expliquer cette dysfonction. L'effet que l'on observe avec le fénofibrate pourrait être la résultante d'une action systémique sur les phénomènes inflammatoires. Cet effet périphérique a également été démontré par la mise en évidence d'une prévention, par le fénofibrate de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles observée dans le tissu hépatique après une ischémie cérébrale (résultats non montrés, obtenus en collaboration avec Daniel Anthony, Université d'Oxford). Cet effet périphérique pourrait être une des composantes de l'action du fénofibrate en complément de son action neuronale ou vasculaire. L'action neuronale possible est montrée par l'effet de l'injection de microparticules contenant du fénofibrate directement dans le tissu cérébral qui induit une diminution importante du volume d'infarctus (Klose et al, *in press*). Au plan vasculaire, des travaux sur un modèle in

vitro de BHE ont montré que l'application d'acide fénofibrique préalablement à l'ischémie (simulée par une déprivation d'oxygène et de glucose) prévenait l'ouverture de la BHE par une action endothéliale (collaboration avec Roméo Cecchelli, Université d'Artois).

III. Perspectives cliniques et thérapeutiques

Nos résultats ont eu ou peuvent avoir un triple impact clinique et thérapeutique : (i) les données expérimentales de protection préventive sous-tendent les résultats cliniques montrant une protection préventive induite par les hypolipémiants ; (ii) le rôle du polynucléaire neutrophile dans la physiopathologie de l'ischémie et des complications hémorragiques incite à l'étudier comme un biomarqueur potentiel ; (iii) la démonstration de l'effet aigu du fénofibrate conduit à proposer son évaluation à la phase aiguë de l'AVC comme agent neuroprotecteur.

III.A. Protection préventive et hypolipémiants

Au-delà de la prévention de survenue par les hypolipémiants, nos résultats sous-tendent l'observation que cette classe médicamenteuse peut induire une protection préventive, mise en évidence par une moindre sévérité de l'ischémie cérébrale. Concernant les hypolipémiants et les AVC, il existait un étrange paradoxe. Bien que le cholestérol soit un facteur de risque dans les maladies cardiovasculaires et les infarctus du myocarde, l'association entre cholestérol et ischémie cérébrale est très controversée. Les études épidémiologiques et observationnelles ne montraient pas d'association claire entre le taux de cholestérol et les causes d'AVC. Cependant des études cliniques ont montré que les statines réduisaient les événements vasculaires en prévention primaire et secondaire dans les maladies coronaires. La plupart de ces études incluaient les AVC et accidents ischémiques transitoires comme événements primaire ou secondaire. En dépit du fait que dans ces cohortes, il n'avait pas été montré d'association entre le taux de cholestérol et les AVC, il était tout de même observé que les statines réduisaient l'incidence des AVC de 25 à 30 %. L'étude SPARCL a été la première étude clinique sur les statines spécifiquement chez les patients qui avaient un AVC ou accident ischémique transitoire. L'étude recrutait des patients qui avaient des taux normaux de cholestérol au début de l'étude et qui n'avaient pas de maladies coronaires. Les patients étaient randomisés et recevaient de l'atorvastatine (80mg/jour) ou le placebo. Pendant les 5 ans de suivi en moyenne, l'atorvastatine réduisait l'incidence des récurrences d'AVC. Cependant il n'a pas été mis en évidence de lien entre les taux de base de LDL-cholestérol et le risque d'AVC (Amarenco et al, 2008).

Plusieurs études rétrospectives ont montré que la prise d'une statine préalablement à la survenue d'un accident ischémique cérébral était associée à une sévérité moindre de la symptomatologie clinique (Sanossian and Ovbiagele, 2007). Dans une étude cohorte prospective, il a été mis en évidence dans une population de 362 patients ayant présenté un accident ischémique sus-tentorial, un score NIH ≤ 5 traduisant une faible sévérité clinique était significativement associé à la prise d'hypolipémiant ou à un exercice physique régulier avant l'accident ou à des antécédents d'accident ischémique transitoire (Deplanque et al, 2006). Dans une étude en cours (protocole Biostroke), une corrélation entre la neuroprotection préventive induite par les hypolipémiants et une modification des marqueurs d'hémostase et d'inflammation est actuellement recherchée. Plus récemment, chez les patients de l'étude SPARCL ayant présenté un accident ischémique cérébral, il a été montré que la sévérité était significativement moindre dans le groupe traité par atorvastatine en comparaison du groupe placebo.

III.B. Le polynucléaire neutrophile : un biomarqueur potentiel ?

En dehors des analyses volumétriques en imagerie, des marqueurs biologiques et de souffrance cérébrale, liés aux voies physiopathologiques de l'ischémie cérébrales pourraient avoir un intérêt diagnostique, mais aussi au plan pronostique (index de sévérité) ou au plan prédictif, en particulier pour anticiper les patients à risques de complications hémorragiques induites par la thrombolyse. Une première étude a montré qu'une concentration plasmatique de MMP-9 élevée est associée à un risque accru de complications hémorragique. Plus récemment, l'étude BRAIN a permis d'identifier un certain nombre de marqueurs de souffrance cérébrale : MMP-9, facteur natriurétique cérébral, le D-dimère, la S100 β (Laskowitz et al, 2009). Il reste à tester la prédictibilité de ces marqueurs au plan diagnostique mais aussi la sensibilité de ces marqueurs vis-à-vis de molécules potentiellement neuroprotectrices. De part son accessibilité et son implication dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale, le polynucléaire neutrophile et son évolution au décours de la survenue d'une ischémie cérébrale, comme le suggère une étude (Buck et al, 2008). Au delà du seul dosage, il est possible de mettre en culture les polynucléaires neutrophiles et d'appliquer des substances, comme le t-PA, pour doser la libération de médiateurs chimiques (Cuadrado et al, 2008). Un tel développement pourrait permettre d'envisager l'utilisation du polynucléaire neutrophile, comme biomarqueur, sous réserve de la démonstration d'une sensibilité vis-à-vis de la prise de certains médicaments.

III.C. Le fénofibrate en traitement aigu ?

A ce jour, dans l'ischémie cérébrale, aucun traitement évalué en clinique n'a été validé. La plupart des traitements avait pour objectif avant tout une protection du tissu neuronal. Tous ces approches se sont soldées par des échecs du fait d'une fenêtre thérapeutique trop courte, d'une toxicité des agents étudiés, d'une mauvaise translation à la clinique. Dès lors des recommandations ont été publiées dans la conduites des études précliniques pour pallier les échecs en clinique humaine. Le NXY-059, une molécule à action vasculaire préférentielle, a été la première molécule qui a été testée selon les recommandations STAIR. Ce dernier avait une action purement vasculaire. Bien que la première étude SAINT I ait montré un bénéfice sur l'ischémie cérébrale et le handicap, la deuxième étude n'a pu confirmé ces résultats, conduisant à l'arrêt du développement du produit. Dès lors, l'idée de protéger l'ensemble de l'unité neurovasculaire semblait être incontournable et nécessaire pour aboutir à une issue favorable en clinique. Parmi d'autres molécules comme l'albumine qui est en cours d'évaluation, le fénofibrate par son action mixte sur le vaisseau et le parenchyme cérébral serait un candidat intéressant. Comme nous l'avons vu, le fénofibrate module la voie inflammatoire et notamment les interactions leucocyte-endothélium.

Des stratégies visant à limiter les interactions des polynucléaires neutrophiles avec la paroi vasculaire ont déjà été étudiées. C'est le cas de l'enlimomab, un anticorps murin anti-ICAM-1. Les études précliniques avaient montré des résultats intéressants mais la translation en clinique s'est révélée infructueuse. Dans l'essai clinique concerné, il était observé une plus grande mortalité dans le groupe traité ainsi qu'une augmentation des effets indésirables à type de fièvre ou d'infections. Un retour en préclinique a montré que cet anticorps murin activait les polynucléaires et le complément pouvant expliquer les effets délétères observés en clinique. Dans notre cas, le fénofibrate est une molécule commercialisée depuis une quarantaine d'années et est responsable de peu d'effets indésirables. Le mode d'action serait similaire à celui de l'enlimomab mais en évitant les risques d'effets indésirables immuno-allergiques liés à la nature du produit. Le fénofibrate en diminuant l'expression des protéines d'adhésion, limiterait les interactions leucocytes-endothélium et serait une approche thérapeutique plus sûre. De plus nos résultats dans le modèle de complications hémorragiques suggèrent que le fénofibrate serait un traitement adjuvant potentiel de la thrombolyse. La mise en place d'une étude serait pertinente mais la mise en œuvre d'une telle étude ne peut être faite qu'au plan académique en regard du fait que le fénofibrate est tombé depuis longtemps dans domaine public.

Conclusion

Au sein de l'unité neurovasculaire, nous avons démontré que les leucocytes, et plus particulièrement les polynucléaires neutrophiles, jouaient un rôle important dans l'inflammation, tant vasculaire que parenchymateuse qui conduit aux lésions cérébrales. Ils participent notamment aux altérations vasculaires post-ischémiques ainsi qu'au risque hémorragique de la thrombolyse. Nos travaux soulignent ainsi que les polynucléaires neutrophiles exerceraient leurs effets délétères préférentiellement à l'interface sang/vaisseau. Ces interactions leucocytes-endothélium représentent une cible pertinente de protection aussi bien de la paroi vasculaire que du tissu cérébral.

Les récepteurs nucléaires PPAR- α représentent expérimentalement une stratégie thérapeutique potentielle de protection de la paroi vasculaire et du tissu cérébral en modulant les interactions leucocytes-endothélium de manière indirecte en diminuant l'expression des protéines d'adhésion. Le fénofibrate, comme d'autres activateurs synthétiques PPAR-alpha, étant utilisé en thérapeutique, offre des perspectives cliniques intéressantes visant à étudier les effets bénéfiques du fénofibrate pour diminuer le risque de complications hémorragiques de la fibrinolyse et augmenter sa fenêtre d'utilisation thérapeutique.

ANNEXE

Article n°6

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

Plaiser F, Bastide M, Ouk T, Pétrault O, Laprais M, Stolc S, Bordet R

Brain Research 2008 ; 1208 : 240-9

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres**BRAIN
RESEARCH****Research Report**

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

F. Plaisier^a, M. Bastide^{a,b,*}, T. Ouk^a, O. Pétrault^a, M. Laprais^a, S. Stolc^c, R. Bordet^a

^aEA1046-Département de Pharmacologie, Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Faculté de Médecine — Université de Lille 2, Centre Hospitalier et Universitaire, 1, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

^bIUT A, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^cInstitute of Experimental Pharmacology, Slovak Academy of Sciences, SK-841 04 Bratislava, Slovak Republic

ARTICLE INFO**Article history:**

Accepted 2 February 2008

Available online 13 February 2008

Keywords:

Cerebral ischemia

Neurological deficit

Cerebral vessel

Potassium channel

Antioxidant agent

ABSTRACT

In a model of 1 hour-intraluminal occlusion of rat middle cerebral artery (MCA), we investigated the spontaneous recovery of vascular functions and functional deficit together with ischemia volume evolution at 24 h, 3 days and 7 days of reperfusion. Infarct cerebral volumes and edema were quantified with histological methods. Endothelium-dependent and smooth muscle potassium inward rectifier current (Kir2.x)-dependent relaxing responses of MCA were tested using Halpern arteriograph and Kir2.x current density evaluated on MCA myocytes with whole-cell patch-clamp technique. Sensorimotor recovery was estimated according to performances obtained with adhesive removal test and prehensile traction test. A time-dependent improvement of smooth muscle K⁺-dependent vasorelaxation and Kir2.x current density is observed at 7 days of reperfusion while endothelium-dependent relaxation is still impaired. In parallel a significant reduction of functional deficit is observed at 7 days of reperfusion together with a time-matched reduction of striatal infarct and edema volumes. Administration of an antioxidant agent, stobadine, at time of reperfusion and 5 h later allowed: (i) a neuroprotective effect with a significant reduction of infarct size compared to vehicle-treated rats; (ii) a prevention of endothelial-dependent relaxation and Kir2.x current density reductions of MCA ipsilateral to occlusion; (iii) a hastening of the functional recovery. The beneficial effect of stobadine underlines a link between vascular protection, neuronal protection and sensorimotor recovery that could become a promising pharmacological target in the treatment of cerebral ischemia.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Stroke is the leading cause of disability in industrialized countries and causing serious neurological deficits developed

according to the localization and the size of infarct. As soon as cerebral blood flow (CBF) is interrupted, brain functions cease within seconds leading to irreversible damage to cellular constituents within minutes. The perfusion deficit affected the

* Corresponding author. EA1046-Département de Pharmacologie, Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Faculté de Médecine — Université de Lille 2, Centre Hospitalier et Universitaire, 1, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France. Fax: +33 3 20 44 68 63.

E-mail address: michele.bastide@univ-lille1.fr (M. Bastide).

ischemic territory constituting two different regions depending on cerebral blood flow value: the ischemic core (CBF < 20% below normal value) where neurons are definitively dead and the penumbra zone (20% < CBF < 40% of normal value) where neurons have the possibility to recover from the damaged processes for all that the reperfusion is quickly initiated. This blood flow reduction is correlated with the severity of brain damage and associated to functional deficits (Bastide et al., 1999; Bastide et al., 2007). Despite the paradox from reperfusion injury, preservation of surviving cells, tissue repair and functional recovery largely depend on appropriate restoration of local blood flow supply. In rats, middle cerebral artery occlusion (MCAO) induces lesions in cortical and striatal regions involved in the processing of sensorimotor information and ischemic animals show behavioural abnormalities that could be scored by specific tests (Zausinger et al., 2000). In humans as well as in rats, some, albeit variable, functional recovery is observed over time and is associated with brain plasticity. The challenge is now to improve this functional recovery in terms of rapidity and performance. Our hypothesis is that the restoration of normal vascular functions of pial arteries after ischemia/reperfusion, using a pharmacological agent, could limit the extent of lesion and improve the post-ischemic recovery of animals.

It has been reported that ischemia/reperfusion episode is associated with vascular functional impairments of occluded artery resulting in an inadequate and uncontrolled cerebral blood flow due to: (i) reduction of Ba-sensitive Kir2.x current density on smooth muscle cells; (ii) loss of relaxation mechanisms induced by the activation of smooth muscle inward rectifier potassium channel (Kir2.x); (iii) reduction of the endothelium-dependent vasorelaxation response to acetylcholine; (iv) loss of the myogenic tone (Bastide et al., 1999; Cipolla et al., 1997; Cipolla and Curry, 2002; Marrelli et al., 1998). Previous results have demonstrated that reperfusion step seems to be a determining mechanism in the outcome of the injury of vascular wall since ischemia alone could not impair the smooth muscle-dependent vasorelaxation and the Kir2.x current density but only induced a partial reduction of the endothelium-dependent relaxation (Pétrault et al., 2004). The vascular impairments of large pial vessels could worsen cerebral infarct lesions particularly in penumbra zone by a reduced blood delivery to parenchymal arterioles. Cerebral cells could recover as soon as reperfusion is restored even though the reset of oxygenated blood flow at the onset of reperfusion generated large amounts of reactive oxygen species (ROS) largely exceeding the intrinsic antioxidant properties of the cells and inducing cellular damages in brain tissue and cerebral vessels (Kontos, 2001).

Based on previous studies, we tested here the potency of stobadine (STO) [(*(-)-cis-2,8-dimethyl-2,3,4,4a,5,9b-hexahydro-1H-pyrido[4,3-b]-indole*)] to improve cerebral vessels functions and functional deficit, at three different post-ischemic times (24 h, 3 days, 7 days). STO has been shown to possess interesting properties useful in our topic particularly a protective effect against lipid peroxidation induced by oxidative stress. Moreover it possessed scavenging properties towards hydroxyl, peroxy and alkoxy radicals, quenched singlet oxygen and preserved oxidation of SH groups (Horakova et al., 1991; Pomfry et al., 1995; Stolc et al., 1997; Horakova and Stolc, 1998). STO

has also shown aortic endothelial protective effect on ischemia/reperfusion induced injury (Sotnikova et al., 1998). All together, these pharmacological properties pointed out STO as a good candidate to improve cerebrovascular functions. The aim of our study was to evaluate in a MCAO rat model the concomitant evolution over time (24 h, 3 and 7 days reperfusion) of vascular impairments, cerebral lesions and functional deficit.

2. Results

2.1. Time-course evolution of cerebral lesions and intrinsic functional recovery

In rats treated with vehicle (VEH), there was a significant reduction of striatal infarct and edema volumes at 7 days of reperfusion ($p < 0.005$) and no significant difference observed for total and cortical infarct volumes. At day 3, there was a non significant trend in increase of total and cortical infarct volumes (Fig. 1A). Performances to the adhesive test removal, used to quantify the sensorimotor impairment of the rats after ischemia/reperfusion, show no difference on the score value obtained by the SHAM-VEH animals before and after surgery (score = 5). With VEH-treated ischemic/reperfused (IR) rats, the score is rather low after 24 h reperfusion and progressively

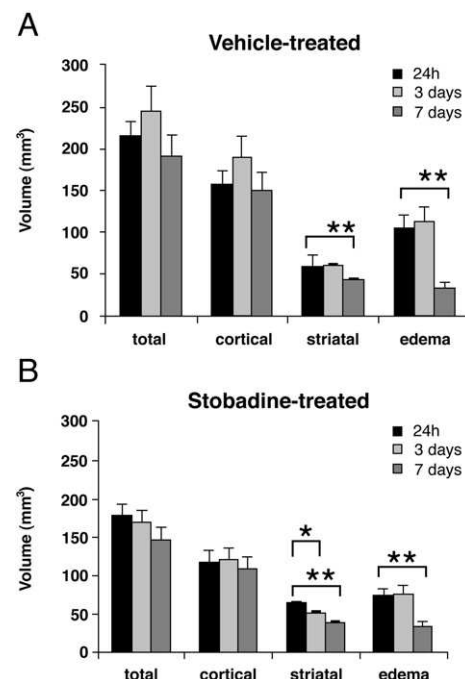


Fig. 1 – Evolution of brain infarcts and edema volumes after MCAO at 24 h, 3 and 7 days post-ischemia from vehicle-treated and stobadine-treated animals. (A) Effect of vehicle on total, cortical, striatal infarct volumes and edema volume (24 h n = 18; 3 days n = 8; 7 days n = 10). (B) Effect of stobadine administration on total, cortical, striatal infarct volumes and edema volume (24 h n = 17; 3 days n = 10; 7 days n = 17). Values are mean $\pm$ s.e.m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$.

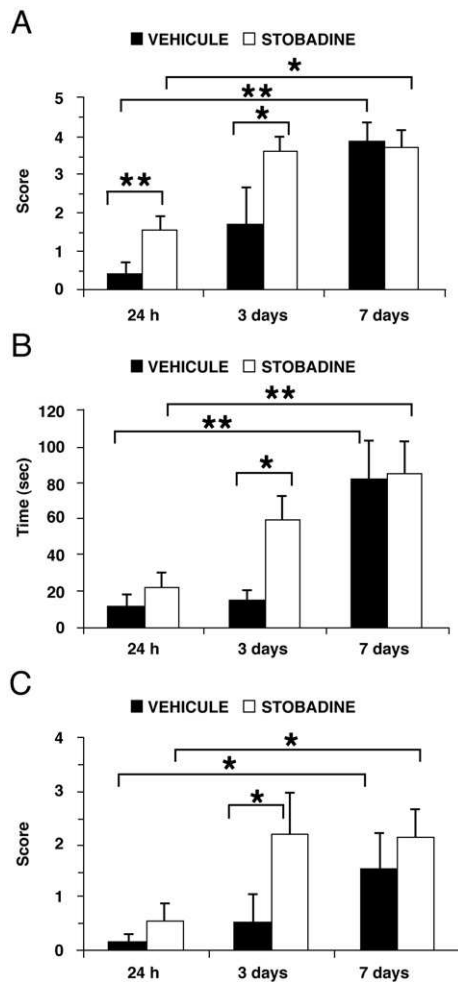


Fig. 2 – Evolution of behavioural functional performances after MCAO at 24 h, 3 and 7 days post-ischemia of vehicle-treated and stobadine-treated animals. (A) Adhesive removal test scores obtained with vehicle- or stobadine-treated animals. (B,C) Prehensile traction test expressed as the time spent on rope (B) and by a score (C). (Vehicle-treated rats: 24 h n=8; 3 days n=6; 7 days n=6; stobadine-treated rats: 24 h n=8; 3 days n=7; 7 days n=13) Values are mean $\pm$ s.e.m. * p <0.05, ** p <0.05.

increased, reaching a significant intrinsic recovery. After 7 days of reperfusion, performance score is 3.83 ± 0.47 compared to a score value of 5 obtained by SHAM animals suggesting that

at 7 days, impairment subsisted due to persistent important ipsilateral lesions (Fig. 2A). In the stobadine-treated IR rats, a progressive reduction of striatal infarct and edema volumes is observed over the time of reperfusion, with statistical significance at 3 days reperfusion concerning striatal infarct volume. Compared to vehicle-treated animals, stobadine prevented the increase trend of total and cortical lesions volumes occurring at 3 days of reperfusion (Fig. 1B). At each reperfusion time, infarct and edema volumes are basically smaller in IR-STO treated rats compared to IR-VEH rats (Table 1). This decrease reached statistical significance for cortical and edema volumes at 24 h reperfusion and for total infarct at 3 days of reperfusion. At 7 days of reperfusion, total and cortical infarct volumes were further reduced in IR-STO treated animals compared to IR-VEH even if it is not statistically significant (Table 1).

The test of prehensile traction appraised the motor impairment of the rats after ischemia/reperfusion (Fig. 2B and C). After surgery, IR-VEH rats demonstrated a very low score at 24 h and 3 days reperfusion associated to a short time spent on the rope and 7 days of reperfusion were necessary to observe a significant increase of score value (1.50 ± 0.64) even if it remained smaller than the maximal value of 5 obtained by SHAM animals. The IR-STO animals better performed to both adhesive removal test and prehensile traction test, since they significantly improved their performance at 3 days of reperfusion. Longer reperfusion time (7 days) did not allow any further significant improvement. An equivalent recovery stage was obtained with and without antioxidant treatment but is significantly hastened by acute stobadine treatment (Fig. 2A, B, C).

2.2. Time course evolution of Kir2.x current density after IR

Kir2.x current density was measured in freshly isolated smooth muscle cells (SMC) originated from MCA of SHAM-VEH and SHAM-STO and from right MCA of IR-VEH and IR-STO animals at 24 h, 3 and 7 days reperfusion. The capacitance values were not different among the different groups: 19.39 ± 0.68 pF (n=9 cells, 4 rats) for SHAM-VEH cells, 20.53 ± 0.71 pF (n=11 cells, 6 rats), 21.16 ± 0.75 pF (n=7 cells, 5 rats) and 22.92 ± 1.02 pF (n=6 cells, 5 rats) at 24 h, 3 and 7 days of reperfusion respectively for IR-VEH rats and 21.21 ± 0.31 pF (n=9 cells, 4 rats) for SHAM-STO rats and 21.22 ± 0.65 pF (n=16 cells, 6 rats) for IR-STO rats. The Kir2.x density values obtained by SHAM animals at 24 h, 3 and 7 days reperfusion are stable through the time and pooled together.

Table 1 – Infarct and edema volumes (mm³) at 24 h, 3 days and 7 days of reperfusion of vehicle-treated and stobadine treated rats

Volumes (mm ³)	24 h		3 days		7 days	
	VEH	STO	VEH	STO	VEH	STO
	n=18	n=17	n=8	n=10	n=10	n=17
Total infarct	215.62 $\pm$ 14.68	177.01 $\pm$ 15.20	243.79 $\pm$ 28.67	168.80 $\pm$ 14.00*	191.09 $\pm$ 22.80	144.54 $\pm$ 16.64
Cortical infarct	157.20 $\pm$ 14.46	114.71 $\pm$ 14.56*	189.27 $\pm$ 23.99	119.00 $\pm$ 13.49*	149.21 $\pm$ 20.50	106.92 $\pm$ 14.37
Striatal infarct	58.44 $\pm$ 2.73	62.29 $\pm$ 2.21	59.25 $\pm$ 2.37	49.80 $\pm$ 2.30	41.88 $\pm$ 3.54	37.62 $\pm$ 2.73
Edema	104.05 $\pm$ 14.07	72.34 $\pm$ 7.82*	111.81 $\pm$ 16.26	74.13 $\pm$ 9.18*	32.33 $\pm$ 6.43	31.31 $\pm$ 6.54

* p <0.05 STO vs VEH.

On Fig. 3A, were plotted on histogram the mean Kir2.x current densities of the VEH-treated animals (SHAM-VEH, IR-VEH at 24 h, 3 days, 7 days reperfusion) at -135 mV, potential inducing the maximal Kir2.x current amplitude. The previously described drastic reduction of Kir2.x current density recorded on IR-VEH SMC after 24 h reperfusion was confirmed, -0.49 ± 0.21 pA/pF versus -1.22 ± 0.47 pA/pF on SHAM-VEH ($p < 0.01$). On SMC obtained from IR rats sacrificed at 3 days and 7 days of reperfusion, the Kir2.x current density progressively and spontaneously recovered through the 7 day post-ischemia period (current-voltage relationships in inset on Fig. 3A) and Kir2.x current densities of SHAM-VEH and IR-VEH at 7 days are superimposed. The current densities expressed versus potential ramp values (IV curve) obtained on vehicle- or stobadine-treated rats at 24 h reperfusion are plotted on Fig. 3B. Well-superimposed IV curves obtained on SHAM-VEH and SHAM-STO SMC

underlined the absence of effect of stobadine on basal Kir2.x amplitude. On IR rats, administration of STO allowed a whole prevention of the Kir2.x IR-induced reduction as described by the superimposition of IV curves of IR-STO, SHAM-VEH and SHAM-STO animals and by the density values at -135 mV (-1.11 ± 0.61 pA/pF, $p < 0.01$ IR-STO vs IR-VEH, Fig. 3B).

2.3. Control of active properties of SHAM and IR middle cerebral arteries

To ensure the active properties of the MCA in SHAM and ischemic animals, we tested: (i) the contractility of the vessels in response to 5-HT; (ii) the smooth muscle-dependent relaxation in response to sodium nitroprusside (SNP); (iii) the rest diameter; (iv) the myogenic tone in response to pressure increase. The absence of differences among SHAM animals at

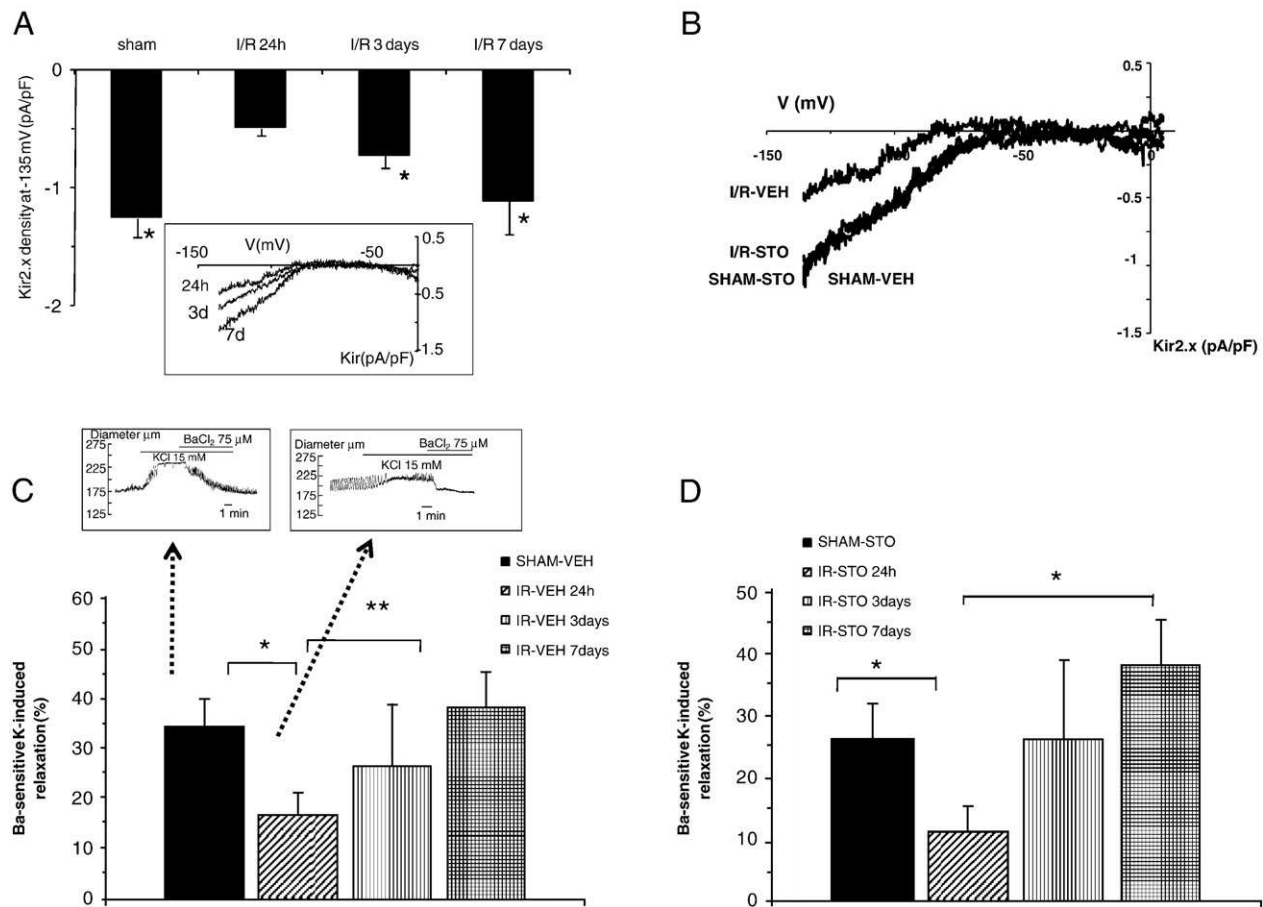


Fig. 3 – Post-ischemic time course of Kir2.x current density, of smooth muscle and endothelium-dependent relaxation alterations in vehicle- and stobadine-treated animals. (A) Mean current densities measured at a potential of -135 mV recorded on smooth muscle cells originated from SHAM-VEH ($n=8$) and I/R-VEH (24 h $n=8$; 3 days $n=7$; 7 days $n=6$). $*p < 0.05$ vs IR-VEH. Inset IV relationships on smooth muscle cells from rats sacrificed at 24, 3 or 7 days post-ischemia. (B) Mean Kir2.x current densities (pA/pF)-potential (mV) relationships recorded from SMC vehicle-treated SHAM ($n=9$) and IR animals at 24 h post-ischemic ($n=6$) and from stobadine-treated SHAM ($n=9$) and IR animals at 24 h post-ischemic ($n=16$). (C) Mean values of Ba-sensitive K-induced relaxations developed by MCA from SHAM animals ($n=14$) and from IR rats sacrificed a 24 h, 3 and 7 days of reperfusion (24 h $n=13$, 3 days $n=10$, 7 days $n=9$). Inset Representative examples of recordings of diameter changes in response to 15 mM KCl and 75 μ M BaCl₂ additions of K⁺-dependent relaxation traces on MCA from SHAM animals and on MCA from rats sacrificed at 24 h reperfusion. (D) Mean values of Ba-sensitive K-induced relaxations developed by MCA from SHAM animals and from IR animals at 24 h, 3 and 7 days of reperfusion. SHAM-STO ($n=20$), I/R-STO (24 h $n=8$, 3 days $n=5$, 7 days $n=6$). Values are mean $\pm$ s.e.m; $*p < 0.05$.

Table 2 – Active properties of middle cerebral artery

	SHAM-VEH		IR-VEH		SHAM-STO	IR-STO		
		24 h	3 days	7 days		24 h	3 days	7 days
Contractility to 5-HT (%)	47.46±2.76 n=5	33.26±2.45** n=6	32.85±2.40** n=5	44.45±5.63 n=5	51.31±3.09 n=9	35.55±4.33** n=4	37.72±5.44* n=4	50.55±4.40 n=5
Rest diameter (μm)	172.58±9.84 n=12	198.00±6.78* n=7	224.40±8.93** n=5	202.33±8.19* n=6	166.13±5.38 n=15	195±9.21* n=4	206.20±14.27** n=5	152.80±6.18# n=5
SNP-relaxation (%)	123.21±14.40 n=11	125.81±10.53 n=13	125.74±13.31 n=9	144.98±19.56 n=9	122.98±16.23 n=15	141.20±17.22 n=7	81.53±15.93 n=4	140.00±49.21 n=6
*p<0.05 IR-VEH vs SHAM-VEH or IR-STO vs SHAM-STO.								
**p<0.005 IR-VEH vs SHAM-VEH or IR-STO vs SHAM-STO.								
#p<0.05 time-matched IR-VEH vs IR-STO.								

24 h, 3 days and 7 days reperfusion let us to pool together the values obtained at these different times. In vehicle-treated animals, IR MCA developed a reduced response to 5-HT at 24 h and 3 days reperfusion compared to SHAM animals which recovered at 7 days. SNP-dependent relaxation was not modified by ischemia-reperfusion. On the other hand, IR MCA was significantly dilated since rest diameter is significantly increased after IR through the 7 days with no recovery (Table 2, left part). Myogenic tone is drastically reduced after IR at 24 h and 3 days of reperfusion but completely recovered at 7 days with superimposition of contraction curves of SHAM and 7 days reperfusion animals (Fig. 4A).

As in vehicle-treated animals, active properties of the MCA in SHAM and ischemic STO-treated animals were tested. The absence of differences among SHAM animals at 24 h, 3 days and 7 days reperfusion let us to pool together the values obtained at these different times. IR-STO MCA developed reduced response to 5-HT with a total recovery at 7 days reperfusion. SNP-relaxation was not modified in STO-treated animals by ischemia-reperfusion. On the other hand, rest diameter is significantly increased after IR at 24 h and 3 days reperfusion but significantly recovered at 7 days (Table 2, right part). Myogenic tone is impaired after IR at 24 h, 3 days but at 7 days it completely recovered as shown by the superimposition of contraction-TMP curves of SHAM-STO and IR-STO (Fig. 4B).

2.4. Time course evolution of smooth muscle K⁺-dependent vasorelaxation after IR

Application of 15 mM of KCl in the superfusate allowed a vasodilation of MCA inhibited by the following addition of 75 μM of BaCl₂ and estimated at 34.30±5.49% (n=13) on SHAM-VEH animals when after 24 h reperfusion, the vasodilation is limited to 16.39±4.29% (n=10) on right MCA of VEH treated animals (relaxation traces illustrated in insets of Fig. 3C). As illustrated on histogram, for IR-VEH rats sacrificed at 3 days or 7 days of reperfusion, the KCl-induced relaxation became progressively more important until a total recovery at 7 days (38.15±7.04%, n=9).

Ba-sensitive KCl-induced relaxation of MCA obtained for SHAM-STO and IR-STO at different reperfusion times has been illustrated on Fig. 3D. In STO-treated IR rats, the alteration of smooth muscle-dependent vasodilation was still present after 24 h reperfusion (11.01±1.86%, n=7, Fig. 3D) and in SHAM-STO animals this vasodilation was comparable to SHAM-VEH ani-

mals (26.29±5.61%, n=10 vs 34.29±5.48, n=14). In IR-STO animals, the restoration of Ba-sensitive KCl-relaxation is more rapidly obtained at a period of 3 days of reperfusion, a value of 26.05±12.79% is reached, similar to the value obtained at 7 days of reperfusion in IR-VEH treated animals.

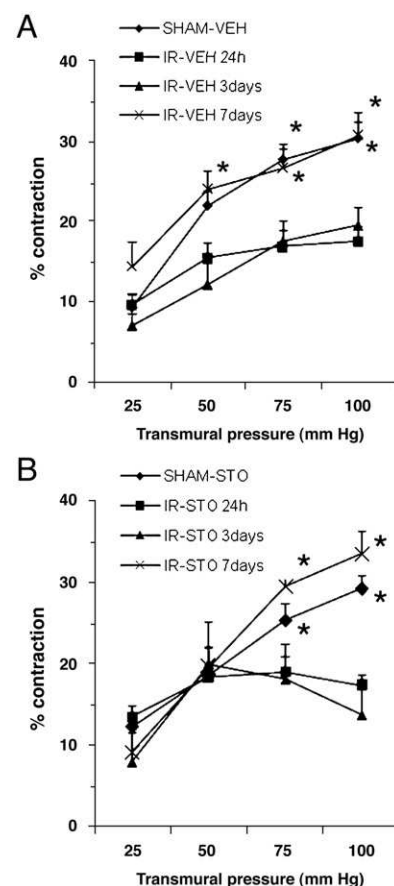


Fig. 4 – Evolution of responses of middle cerebral arteries (MCA) to transmural pressure increase at different times of reperfusion compared to SHAM animals. (A) MCA responses of vehicle-treated animals (SHAM-VEH: n=11; I/R-VEH: 24 h n=6; 3 days n=5; 7 days n=5). *p<0,05 vs SHAM-VEH. (B) MCA responses of stobadine-treated animals (SHAM-VEH: n=9; I/R-VEH: 24 h n=4; 3 days n=4; 7 days n=5). *p<0,05 vs STO-VEH).

2.5. Time course evolution of endothelial-dependent vasorelaxation after I/R

Endothelial relaxation function of MCA was tested by application of acetylcholine on 5-HT-precontracted arteries. Addition of acetylcholine (ACh) induced a vasodilation of MCA from SHAM animals at 3.10^{-5} M ACh of $23.74 \pm 2.19\%$ ($n=9$) of increased diameter (Fig. 5A). As no difference existed in SHAM-animals MCA endothelial vasodilation at the different intervals of sacrifice, the mean value for SHAM MCA was plotted on the histogram. Right MCA from IR-VEH showed a significant reduction of the ACh-induced vasodilation with a value at 3.10^{-5} M of ACh of $12.31 \pm 1.42\%$ ($n=6$) of increased diameter. This alteration of ACh-dependent vasodilation is maintained at 3 and 7 days of reperfusion without any improvement.

Endothelium-dependent relaxation is tested on STO-treated rats. 3.10^{-7} M ACh induced a vasodilation on IR-STO MCA at 24 h, 3 and 7 days reperfusion of $20.72 \pm 2.63\%$, $18.01 \pm 3.3\%$, $19.64 \pm 2.96\%$ respectively, comparable with amplitude relaxation obtained on SHAM animals ($23.74 \pm 2.19\%$) demonstrating

the total protective effect of STO on endothelial-dependent relaxing capacity in IR-induced impairment (Fig. 5B).

3. Discussion

Transient middle cerebral artery occlusion induces functional deficit associated to neuronal and vascular lesions (Bastide et al., 1999, 2003; Pétrault et al., 2004). In this study we provide the first evidence of a parallel and partial recovery of vascular smooth muscle lesions, neuronal lesions and functional deficit through a 7 day post-ischemic reperfusion period. Furthermore, our data suggest that these recovery mechanisms could be enhanced and hastened by the administration of a pharmacological agent, the stobadine. The following observations are consistent with the beneficial effect of STO: (1) global reduction of infarct and edema volumes; (2) hastening of functional deficit recovery; (3) total prevention of smooth muscle Kir2.x current density reduction and of the associated potassium-dependent relaxation impairment; (4) total prevention of endothelium-dependent vasodilation impairment; (5) total recovery of MCA rest diameter.

The results obtained with STO treatment showed a very effective action in reducing infarct volumes caused by transient middle cerebral artery since 24 h of reperfusion. Vehicle-treated animals did not show any positive evolution of infarct volumes at 7 days indicating that infarct volume reduction would need longer time (Brown et al., 2007). Protective effects of STO are presumably related to its free radical trapping properties and the main important sites of STO-induced protection concerned with the membrane lipids. STO has been shown to protect the integrity and the function of the neuronal cellular membrane as well as of the intracellular organelle membranes such as mitochondria and endoplasmic reticulum (Stolc et al., 1997). Associated to its neuroprotective effect, STO showed vasculoprotective effect with intrinsic vasoactive properties recoveries of I/R middle cerebral artery. In VEH-treated animals, the vascular reactivity recovery revealed a discrepancy between smooth muscle and endothelial compartments with the restoration of the K^+ -dependent vasodilation, of myogenic tone and of 5-HT contraction at 7 days of reperfusion but a persistent alteration of rest diameter and of endothelium-dependent relaxation. Reperfusion step is responsible of Kir2.x current density reduction, potassium-dependent vasodilation alteration, loss of myogenic tone and of a maximal impairment level of endothelium-dependent vasodilation suggesting the deleterious effect of free radicals generated at reperfusion (Cipolla et al., 1997; Bastide et al., 1999; Pétrault et al., 2004). Proteins underlying the ionic transport pathways could be functionally damaged by ROS and inefficient to ionic transport (Kourie, 1998). Kir2.x channels owned cysteine residues, essential to form a functional channel. Oxidation of these thiol residues could alter channel function and explained the Kir2.x density reduction on smooth muscle cells with a deleterious outcome on the associated impaired Ba-sensitive K-dependent relaxation at 24 h reperfusion (Garneau et al., 2003; Rozanski and Xu, 2002). STO by its antioxidative properties could preserve SH groups and prevented the deleterious effect of free radicals on Kir channel function. But STO did not hasten the recovery of K^+ -dependent dilation suggesting that another pathological mechanism is

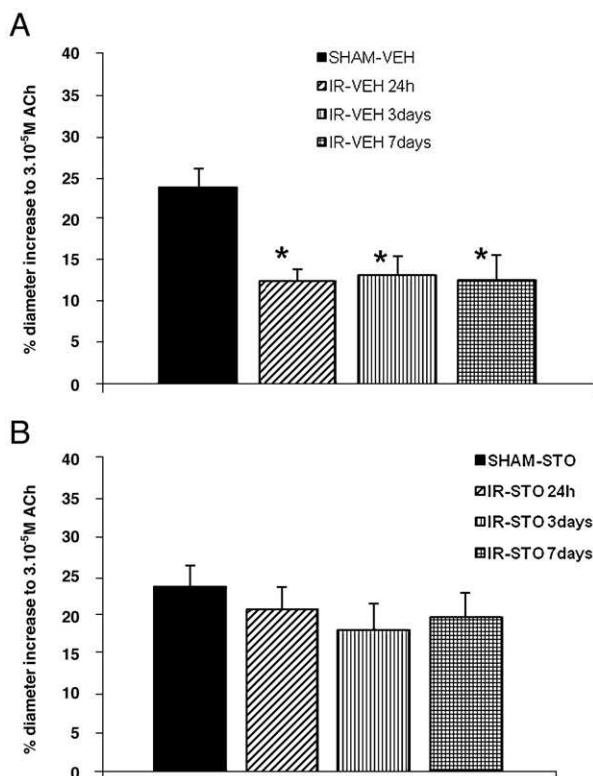


Fig. 5 – Post-ischemic time course of endothelium-dependent relaxation alterations in vehicle- and stobadine-treated animals. (A) Endothelial-dependent relaxation in response to ACh (3.10^{-5} M) by measurements of the percent of diameter increase of MCA originated from SHAM-VEH ($n=8$), I/R-VEH (24 h $n=6$; 3 days $n=5$; 7 days $n=6$). * $p<0,05$ vs SHAM-VEH. (B) Endothelial-dependent relaxation in response to ACh (3.10^{-5} M) by measurements of the percent of diameter increase of MCA originated from SHAM-STO ($n=8$), I/R-STO (24 h $n=4$; 3 days $n=5$; 7 days $n=5$). * $p<0,05$ vs SHAM-STO.

involved that could be related to the defect of myogenic tone and of rest diameter persisting after 24 h reperfusion. Cipolla and Curry (2002) have involved a post-ischemic ultrastructural defect due to a deleterious effect of ischemia/reperfusion on actin cytoskeleton as a mechanism of myogenic tone damage.

The impairment of endothelial-dependent vasorelaxation in response to NO release by acetylcholine observed after IR is due to both ischemia and reperfusion steps. Ischemia was responsible for an intermediate but significative reduction of ACh-induced vasodilation and reperfusion increased this alteration that persisted over the 7 days of reperfusion (Bastide et al., 2003; Cipolla et al., 1997). Different deleterious mechanisms appeared over time and developed for several weeks: (i) polymorphonuclear neutrophils (PMN) activation (Beauchamp et al., 1999; Pétrault et al., 2005; Ritter et al., 2000); (ii) structural alterations (Nishigaya et al., 1991; Del Zoppo and Mabuchi, 2003); (iii) reactive oxygen species formation (Cai and Harrison, 2000); (iv) decrease of NO availability (Cai and Harrison, 2000; Drexler, 1999; Lee et al., 2000). These mechanisms, particularly the inflammatory response, could explain the lack of recovery of endothelium-dependent relaxation at 7 days of reperfusion (Dirnagl et al., 1999). Persistence of the endothelial injury and of dilated rest diameter would produce a lack of blood flow control in the infarct zones that could worsen cell necrosis over time. We have previously showed that administration of a pure antioxidant agent, a synthetic flavonoid dt-BC, during reperfusion was not able to prevent endothelial dysfunction but the preventive administration of low doses of a pleiotropic agent, lipopolysaccharide (LPS), allowed both protections of endothelial and smooth muscle functions in parallel to neuronal protection (Bastide et al., 2003; Pétrault et al., 2004). This LPS endothelial protective effect has been attributed to a post-ischemic increase of NO synthase type III expression in cerebral blood vessel (Puisieux et al., 2000). Here, the total protection of endothelium response to ACh obtained by STO administration could be attributed to both protective effects: (i) the capacity of STO to prevent superoxide radical generation and the formation of the very toxic ONOO⁻ radical. Superoxide production by neutrophils is accelerated following reperfusion and reacts with NO to produce peroxynitrite (Guzik et al., 2002). By limiting superoxide production STO preserved NO availability and allows the NO-dependent acetylcholine response to develop on IR MCA of STO-treated animals; (ii) the potency of STO to induce a prevention of the endothelium-dependent relaxation injury by a preservation of the endothelial layer ultrastructure and the activation of cell proliferation mechanisms (Sotnikova et al., 1998; Franko et al., 1999). Recently, this last mechanism has been involved to explain the erythropoietin-induced neurovascular protection after focal cerebral ischemia in mice by enhancement of proliferation of endothelial cells allowing an angiogenic activity and a restoration of cerebral blood flow (Li et al., 2007).

These results support the hypothesis that endothelium repair plays an important role since the level of neuroprotection reached with endothelium function recovery (STO-treated animals) is higher than that observed on vehicle-treated animals where endothelium impairment subsisted and smooth muscle function recovered. Concomitantly, a reduction of ischemic-induced functional deficits is observed. Functional recovery following stroke in non-treated rats revealed an improvement of

motor and sensitive deficits between 24 h and 7 days even if they did not reach pre-ischemic performances and were still significantly reduced at the end of the study period meaning that either a longer reperfusion period would be considered or that a total recovery could not be reached. Freret et al. (2006) evidenced, in the same model of MCAO, a persistence of deficit in the removal of adhesive in vehicle-treated rats until 10 weeks of reperfusion and the improvement, following deferoxamine administration, an iron chelator, of the rate of functional recovery with a reduction of the level of somatosensory neglect with the removal of adhesive test. Prehensile traction test data showed that MCAO-induced impairment of motor function was maximal at 24 h reperfusion and progressively improved at 7 days post-ischemia. Contrary to the results of Zausinger et al. (2000), in our study the rats were naive for the prehensile traction test and performed it a single time preventing any fatigue or disinterest of animals to the test and results were more reliable. Significant acceleration of functional recovery was obtained with STO-treated rats compared to VEH-treated animals at 24 h and 3 days of reperfusion. This acceleration could be linked to the significative reduction of lesions volumes (cortical infarct and edema) observed at 3 days in STO-treated compared to vehicle-treated rats. After 7 days of reperfusion, performances were similar in vehicle- and STO-treated rats meaning that STO fasted spontaneous recovery but without higher improvement. This is time-matched with the significative but similar reduction level of edema and striatal volumes in both rat groups, vehicle and stobadine. Ischemic edema is known to be one of the major causes of clinical deterioration and worsening of neurological deficit and its reduction is essential for a partial functional recovery (Ayata and Ropper, 2002).

The prevention of oxidative neuronal cell damage is recognized to reduce ischemic consequences and to upgrade cerebral plasticity (axonal/dendritic outgrowth) and synaptic plasticity (Gonzalez-Peres et al., 2002; Wu et al., 2006). Brain reorganization of cerebral activities (axonal and dendritic outgrowths, synaptogenesis) is involved in the restoration of sensorimotor function owing to an activation of contralateral areas and a recruitment of perilesional cortical regions (Bruehl et al., 2000; Sicard et al., 2006). The recovery of vascular reactivity, Kir2.x activation and its associated K⁺-dependent relaxation, endothelium-dependent relaxation, and rest diameter would undoubtedly contribute to tissue repair by allowing a suitable blood flow to supply to the metabolism of neuronal cells. Whether the drug has also a direct protective effect on neurons by promoting neuroregeneration remains to be determined.

4. Experimental procedures

All experiments were performed in strict accordance with the guidelines of the National Institutes of Health and French Department of Agriculture, on male Wistar rats weighing 280–320 g (IFFA Credo, FRANCE) using rat middle cerebral artery (MCA) occlusion model (MCAO).

4.1. Experimental protocol

Four groups of animals were constituted: vehicle-treated SHAM-operated rats (SHAM-VEH), vehicle-treated IR rats (IR-VEH),

stobadine-treated SHAM-operated rats (SHAM-STO), stobadine-treated IR rats (IR-STO). Vehicle (saline solution, 0.9% NaCl) or stobadine (1 mg/kg) was administered by two intravenous injections (IV) in jugular vein 1 h and 6 h after the beginning of MCAO. The animals were sacrificed at 24 h, 3 days or 7 days of reperfusion. The following parameters: brain infarct volume, Kir2.x density on cerebral vascular muscle cells, vasoreactivity of middle cerebral artery, functional deficit were evaluated at different times of reperfusion.

4.2. MCA occlusion model

Anesthesia was induced by intraperitoneal (IP) injection of chloral hydrate (300 mg/kg). A rectal probe was inserted and body temperature maintained at 37 ± 0.5 °C. The ostium of the MCA was occluded intraluminally as previously described (Bastide et al., 1999). Briefly, a 4/0 monofilament nylon suture with its tip rounded by flame heating 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. After 60 min, the suture was carefully removed to permit reperfusion for a duration of 24 h, 3 or 7 days. The animals were placed in cage to recover from anesthesia at room temperature and were allowed to eat and drink freely. The similar surgical procedure is realized on SHAM animals except the introduction of the suture.

4.3. Behavioural testing

The tests were realized in post-ischemic operated rats after ischemia and in SHAM rats at three different intervals of reperfusion: 24 h, 3 days and 7 days.

4.3.1. Adhesive removal test

Two small adhesive paper dots as bilateral tactile stimuli were firmly and accurately attached to each wrist of the forelimbs of the rat so that they covered the hairless part of the forepaw. The rats were familiarized with the testing environment and trained 5 times a day for 5 days before surgery. Only the rats able to remove the adhesive paper dots in less than 10 s were included in the protocol and subjected to MCAO (Chen et al., 2001; Schallert et al., 1986). They were tested at 24 h, 3 or 7 days after surgery and evaluated according to a 6 level score scale: score 5: the rat succeeded to remove both adhesive paper dots in less than 10 s; score 4: the rat removed the adhesive paper dot from ipsilateral side of the occlusion and tried from the contralateral one; score 3: the rat removed the adhesive paper dot from ipsilateral side of the occlusion but didn't try from the contralateral one; score 2: the rat didn't succeed to remove any of the adhesive paper dots but tried on both sides; score 1: the rat tried to remove the adhesive paper dot on the ipsilateral wrist but didn't succeed; score 0: the rat didn't try to remove the adhesive paper dots.

4.3.2. Prehensile traction

A 60 cm long and 0.3 cm diameter stainless steel wire was placed horizontally 40 cm above a foam pad (Zausinger et al., 2000). The rats were naive for this test and only tested after IR. Their forepaws were placed onto the rope and released. The behaviour of the animals was observed. The animals received a score according to a 6 level score scale: score 5: the rat reached one of the vertical bar within 30 s; score 4: the rat was able to hold the rope

with its four limbs and its tail and moved on the bar during 5 s; score 3: the rat was able to hold the rope with its four limbs and its tail but didn't move; score 2: the rat was able to hold the rope with its four limbs; score 1: the rat gripped the rope during 30 s but not with less than 4 limbs; score 0: the rat fell in less than 30 s. Moreover the absolute falling time was also measured.

4.4. Infarct volume measurement

Twenty-four hours, 3 days or 7 days after reperfusion the rats were killed with an overdose of pentobarbital (200 mg/kg, IP) and brains were rapidly removed in an ice-cold Krebs solution (in mM: NaCl 119; NaHCO₃ 24; KCl 4.7; KH₂PO₄ 1.18; MgSO₄·7H₂O 1.17; glucose 10; CaCl₂ 1.6; pH 7.4) gassed with 5% CO₂/95% O₂. MCAs were carefully dissected for smooth muscle cell preparation or for vasoreactivity analysis and thereafter brains were frozen for histological study of infarct size after staining of brain slices (50 µm thick) with Cresyl Fast Violet. The unstained area of the brain was defined as infarcted. A corrected total infarct volume was calculated to compensate for the effect of brain edema (Lin et al., 1993) using the following equation: Corrected infarct volume = Total infarct volume × (Left hemisphere volume / Right hemisphere volume) (Bastide et al., 1999).

4.5. Electrophysiological study

All experiments were done on freshly dissociated cerebral smooth muscle cells obtained from MCAs ipsilateral to occlusion of IR rats and from MCA of SHAM animals by an enzymatic procedure (Bastide et al., 1999). The whole-cell patch-clamp technique was used to evaluate Kir2.x current density. The pipettes (2.7 to 3.3 MΩ) were filled with the pipette solution containing (in mM): 130 KCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, 5 phosphocreatine, pH 7.3. The extracellular solution contained (in mM): 134 NaCl, 6 KCl, 1 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 10 HEPES, pH 7.4. All experiments were performed at room temperature (19–22 °C).

The standard voltage clamp protocol consisted of 185 ms-voltage ramps from –140 to +50 mV, from a holding potential (HP) of –60 mV. In each experiment, currents in response to four voltage ramps were averaged to give the final values presented in this study. To accurately evaluate the Kir2.x current, we added 0.5 mM BaCl₂ to the extracellular solution to completely inhibit the Kir2.x current (Quayle et al., 1993). The residual barium-insensitive current was subtracted from the total one to unmask the Kir2.x component. The current density (current amplitudes normalized to cell membrane capacitance) was calculated (pA/pF) and preferentially used to compare among the different cells to eliminate variation of the cell size.

4.6. Preparation of arterial segment and pressurized arteriograph system

Segment of dissected right MCA was mounted on two glass cannulas within the arteriograph chamber (Living Systems Instrumentation, Burlington, Vermont, USA) perfused with Krebs solution equilibrated with 5% CO₂/95% O₂ and maintained at 37 °C and pH 7.4. The distal cannula was closed in order to work in no flow condition and the proximal one was connected to a

pressure transducer, a miniature peristaltic pump and a servo controller that continually adjusted transmural pressure. The arteriograph system was positioned on the stage of an inverted microscope equipped with a video camera and a monitor. The lumen diameter was measured by image analysis with a video dimension analyser.

Mounted and pressurized arteries were equilibrated at a transmural pressure (TMP) of 25 mm Hg for 1 h to stabilize before experiments. To evaluate myogenic reactivity, the TMP was increased step by step in increments of 25 mmHg from 25 to 100 mmHg and arterial diameter was recorded at each TMP once stable (5 min). Then, the TMP was adjusted at 75 mm Hg for the remainder of the experiment and rest diameter recorded at 75 mmHg. The endothelium-dependent relaxing responses obtained following superfusion of acetylcholine (ACh 3.10^{-5} M) or SNP (10^{-5} M) were respectively expressed as the % of increase of the luminal diameter after pre-constriction with serotonin (5-HT 10^{-6} M) which induced 90% of the maximum constriction. After washout with fresh Krebs solution allowing the return to basal diameter, a 15 mM KCl-containing Krebs solution was superfused to the vessel to achieve a Kir2.x smooth-muscle dependent vasodilation that is inhibited by administration of BaCl₂ (75 μ M). Ba-sensitive K⁺-dependent vasorelaxation is estimated as the Ba-sensitive part of the K⁺-increase of the basal tone diameter. Contractility to 5-HT is estimated as the ratio of the difference between the value obtained at 75 mmHg in the presence of papaverine (pap) and the value obtained in the presence of 5-HT (10^{-6} M) by the value obtained at 75 mmHg $[(D_{\text{pap75mmHg}} - D_{\text{5-HT75mmHg}}) / D_{\text{pap75mmHg}}] \times 100$. At the end of each experiment and after another 25 mmHg TMP equilibration, TMP was once again increased by 25 mmHg increment steps from 25 to 100 mmHg in addition with papaverine (10^{-5} M), a phosphodiesterase inhibitor, to record passive fully relaxed diameter.

4.7. Reagents and drugs

Saline solution components and all chemicals were obtained from Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France. Stobadine is a kind gift of Professor S. Stolc from the Institute of Experimental Pharmacology of the Slovak Academy of Sciences (Stolc et al., 1983).

4.8. Statistical analysis

All values were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (s.e.m.). Continuous variables (infarct volumes, Kir2.x densities, MCA relaxations, vascular parameters and functional impairment) were compared with a one-way ANOVA followed, when ANOVA was significant, by a post-hoc Protected Least Significant Difference (PLSD) Fisher test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Acknowledgments

This work was supported by Conseil Régional du Nord-Pas de Calais, Fondation Paul Hamel, FEDER and Fondation pour la Recherche Médicale. FP is a recipient from Université Lille2 and Conseil Régional du Nord-Pas de Calais.

REFERENCES

- Ayata, C., Ropper, A.H., 2002. Ischaemic brain oedema. *J. Clin. Neurosci.* 9, 113–124.
- 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.
- Bastide, M., Gelé, P., Pétrault, O., Pu, Q., Caliez, A., Robin, E., Deplanque, D., Duriez, P., Bordet, R., 2003. Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide in parallel to brain ischemic tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 399–405.
- Bastide, M., Ouk, T., Plaisier, F., Pétrault, O., Stolc, S., Bordet, R., 2007. Neurogliovascular unit after cerebral ischemia: is the vascular wall a pharmacological target. *Psychoneuroendocrinology* 32, S36–S39.
- Beauchamp, P., Richard, V., Tamion, F., Lallemand, F., Lebreton, J.P., Vaudry, H., Daveau, M., Thuillez, C., 1999. Protective effects of preconditioning in cultured rat endothelial cells: effects on neutrophil adhesion and expression of ICAM-1 after anoxia and reoxygenation. *Circulation* 100, 541–546.
- Brown, C.E., Li, P., Boyd, J.D., Delaney, K.R., Murphy, T.H., 2007. Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodelling in cortical tissues recovering from stroke. *J. Neurosci.* 27, 4101–4109.
- Bruehl, C., Neumann-Haefelin, T., Witte, O.W., 2000. Enhancement of whole cell calcium currents following transient MCAO. *Brain Res.* 884, 129–138.
- Cai, H., Harrison, D.G., 2000. Middle cerebral artery function after stroke: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87, 840–844.
- Chen, J., Li, Y., Wang, L., Zhang, Z., Lu, D., Lu, M., Chopp, M., 2001. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32, 1005–1011.
- Cipolla, M.J., Curry, A.B., 2002. Middle cerebral artery function after stroke. The threshold duration of reperfusion for myogenic activity. *Stroke* 33, 2094–2099.
- Cipolla, M.J., McCall, A.L., Lessov, N., Porter, J.M., 1997. Reperfusion decreases myogenic reactivity and alters middle cerebral artery function after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 28, 176–180.
- Del Zoppo, G.J., Mabuchi, T., 2003. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 879–894.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391–397.
- Drexler, H., 1999. Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovasc. Res.* 43, 572–579.
- Franko, J., Pomfy, M., Novakova, B., Benes, L., 1999. Stobadine protects against ischemia-reperfusion induced morphological alterations of cerebral microcirculation in dogs. *Life Sci.* 65, 1963–1967.
- Freret, T., Valable, S., Chazalviel, L., Saulnier, R., MacKenzie, E.T., Petit, E., Bernaudin, M., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., 2006. Delayed administration of deferoxamine reduces brain damage and promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1757–1765.
- Garneau, I., Klein, H., Parent, L., Sauvé, R., 2003. Contribution of cytosolic cysteine residues to the gating properties of the Kir2.x inward rectifier. *Biophys. J.* 84, 3717–3729.
- Gonzalez-Peres, O., Gonzalez-Casteneda, R.E., Huerta, M., Luquin, S., Gomez-Pinedo, U., Sanchez-Almaraz, E., Navarro-Ruiz, A., Garcia-Estrada, J., 2002. Beneficial effects of a-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neurosci. Lett.* 321, 100–104.

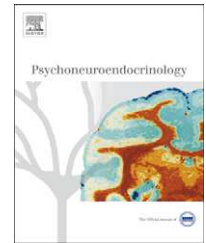
- Guzik, T.J., West, N.E.J., Pillai, R., Taggart, D.P., Channon, K.M., 2002. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension* 39, 1088–1094.
- Horakova, L., Stolz, S., 1998. Antioxidant and pharmacodynamic effects of pyridindole stobadine. *Gen. Pharmacol.* 30, 627–638.
- Horakova, L., Uraz, V., Ondrejickova, O., Lukovic, L., Juranek, I., 1991. Effect of stobadine on brain lipid peroxidation induced by incomplete ischemia and reperfusion. *Biomed. Biochim. Acta* 50, 1019–1025.
- Kontos, H.A., 2001. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Stroke* 32, 2712–2716.
- Kourie, J.T., 1998. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am. J. Physiol.* 275, C1–C24.
- Lee, J.M., Grabb, M.C., Zipfel, G.J., Choi, D.W., 2000. Brain tissue responses to ischemia. *J. Clin. Invest.* 106, 723–731.
- Li, Y., Zhongyang, L., Keogh, C., Yu, S.P., Wei, L., 2007. Erythropoietin-induced neurovascular protection, angiogenesis, and cerebral blood flow restoration after focal ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1043–1054.
- 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.
- Marrelli, S.P., Johnson, T.D., Khorovets, A., Childres, W.F., Bryan, R.M., 1998. Altered function of inward rectifier potassium channels in cerebrovascular smooth muscle after ischemia/reperfusion. *Stroke* 29, 1469–1474.
- Nishigaya, K., Yoshida, Y., Sasuga, M., Nukui, H., Ooneda, G., 1991. Effect of recirculation on exacerbation of ischemic vascular lesions in rat brain. *Stroke* 22, 635–642.
- Pétrault, O., Bastide, M., Cotellet, N., Gelé, P., Gautier, S., Laprais, M., Vamecq, J., Duriez, P., Bordet, R., 2004. The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivative 3'5'-di-tert-butyl-chalcone is parallel to preventive effect on post-ischemic Kir2.x impairment but not to postischemic endothelial dysfunction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 370, 395–403.
- Pétrault, O., Ouk, T., Gautier, S., Laprais, M., Gelé, P., Bastide, M., Bordet, R., 2005. Pharmacological neutropenia prevents endothelial dysfunction but not smooth muscle functions impairment induced by middle cerebral artery occlusion. *Br. J. Pharmacol.* 144, 1051–1058.
- Pomfy, M., Franko, J., Novakova, B., Marsala, J., Skuba, J., 1995. Effects of stobadine on survival, histopathological outcome and acid-base status after global brain ischemia in dogs. *J. Brain Res.* 3, 365–378.
- Puisieux, F., Deplanque, D., Pu, Q., Souil, E., Bastide, M., Bordet, R., 2000. Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *Eur. J. Pharmacol.* 389, 71–78.
- Quayle, J.M., McCarron, J.G., Brayden, J.E., Nelson, M.T., 1993. Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* 265, C1363–C1370.
- Ritter, L.S., Orozco, J.A., Coull, B.M., McDonagh, P.F., 2000. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke. *Stroke* 31, 1153–1161.
- Rozanski, G.J., Xu, Z., 2002. Sulfhydryl modulation of K⁺ channels in rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 1623–1632.
- Schallert, T., Hernandez, T.D., Barth, T.M., 1986. Recovery of function after brain damage: severe and chronic disruption by diazepam. *Brain Res.* 379, 104–111.
- Sicard, K.M., Henninger, N., Fisher, M., Duong, T.Q., Ferris, C.F., 2006. Long-term changes of functional MRI-based brain function, behavioral status, and histopathology after transient focal cerebral ischemia rats. *Stroke* 37, 2593–2600.
- Sotnikova, R., Okruhlicova, L., Noskovic, P., 1998. Endothelial protective effect of stobadine on ischaemia/reperfusion-induced injury. *Gen. Physiol. Biophys.* 17, 253–264.
- Stolz, S., Bauer, V., Benes, L., Tichy, M., 1983. Medicine with antiarrhythmic and antihypoxic activity and its method of preparation. Patents: CS 229067, SWED.8204693-9, Belg. 894148, SWISS 651 754, BRD P-323 1088, SPAIN 553 017, JAP. 151 4040.
- Stolz, S., Vlkolinsky, R., Pavlasek, J., 1997. Neuroprotection by the pyridindole stobadine: a minireview. *Brain Res. Bull.* 42, 335–340.
- Wu, A., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2006. Dietary curcumin counteracts the outcome of traumatic brain injury on oxidative stress, synaptic plasticity, and cognition. *Exp. Neurol.* 197, 309–317.
- Zausinger, S., Hungerhuber, E., Baethmann, A., Reulen, H.J., Schmid-Elsaesser, R., 2000. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res.* 863, 94–105.

Article n°7

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

Bastide M, Ouk T, Plaisier F, Pétrault O, Stolc S, Bordet R

Psychoneuroendocrinology 2007 ; 32 : S36-9



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

M. Bastide^{a,b}, T. Ouk^a, F. Plaisier^a, O. Pétrault^a, S. Stolc^c, R. Bordet^a

^aLaboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, 1, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

^bIUT A, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^cInstitute of Experimental Pharmacology, Slovak Academy of Sciences, SK-841 04 Bratislava, Slovak Republic

Received 24 January 2007; received in revised form 23 March 2007; accepted 23 March 2007

KEYWORDS

Cerebral ischemia;
Cerebral vessel;
Neurological deficit;
Potassium channel;
Pharmacological neuroprotection;
Pharmacological vasculoprotection

Summary

Ischemic stroke induces drastic alterations of the functions of the neurogliovascular unit with dramatic consequences on the well-being of the patients in terms of cognitive and motor handicap. Nowadays, only very few therapeutics are available as a treatment of ischemic stroke. Ischemia is a multifactorial pathology involving different cerebral cellular components such as neurons, astrocytes and vessels working as a functional unit. Recent experimental strategy investigation involving different agents with antioxidant properties (dt-BC, stobadine) or pleiotropic effects (lipopolysaccharide, LPS) has been developed to evaluate whether the vascular wall could be considered as a potential target in neuroprotection concept.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In industrialized countries, cerebral ischemia is the third cause of mortality, the second cause of dementia and the first cause of disability. Ischemic stroke is due to a transient or a permanent reduction of cerebral blood flow (CBF) and according to the level of CBF, the affected brain areas can be divided into two regions depending on the impairment of cerebral blood flow: the core area where CBF is highly impaired causing cell death due to necrotic mechanism and

the penumbra with reduced CBF, where cell survival could be achieved by restoring the blood flow by a rapid reperfusion. Different pathological mechanisms have been described to be involved in the ischemia process: they include excitotoxicity, peri-infarct depolarisations, oxidative stress (enhanced by reperfusion), followed by inflammation and apoptosis processes (Dirnagl et al., 1999). In penumbra, neuronal, glial and vascular cells functions are disturbed by ischemia and the improvement of reperfusion represents a vital challenge for cell survival. The level of cerebral blood flow in penumbra is partly dependent on vascular functions and the deleterious consequences of cerebral ischemia on the functional properties of the cerebral vessels must be defined, as their protection during ischemia/reperfusion may represent a potent pharmacological target to preserve neuronal and glial integrity.

Corresponding author. Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, 1, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France.
Tel.: +33 3 20 44 54 49; fax: +33 3 20 44 68 63.

E-mail address: michele.bastide@univ-lille1.fr (M. Bastide).

2. Functional neuro-glio-vascular unit as a metabolic coupling

Among the different mechanisms that govern the vascular basal tone, three main mechanisms specific to resistance arteries have been precisely investigated: the smooth muscle K^+ -dependent relaxation due to an increase of specific smooth muscle potassium inward rectifier currents, Kir2.x, the endothelial ACh-dependent relaxation via the nitric oxide (NO) pathway and the myogenic tone (vascular resistance to perfusion pressure increase).

The smooth muscle K^+ -dependent relaxation belongs to a brain-specific mechanism called "potassium siphoning" based on potassium ions movement inside the neurogliovascular unit, from the neurons, through the glial cells to the vessels (Fig. 1). This signal is known as a coupling between neuronal activity and energy delivery by blood since blood flow fastly increases after neuronal stimulation resulting in rapid satisfaction of energy demand. First, following neuronal activity, there is an increase in interstitial K^+ concentration resulting from the efflux of K^+ out of neurons. These K^+ ions are immediately buffered by an uptake system in astrocytes processes via ionic transport systems to prevent an anomalous external potassium concentration increase.

The excess of K^+ is then released by astrocytes foot processes, close to cerebral arteries. The local slight increase of K^+ concentration allows the activation of smooth muscle potassium inward rectifier Kir2.x currents inducing a hyperpolarisation of smooth muscle cells, a closure of voltage-dependent calcium channels, a decrease of intracellular calcium concentration and then a vasodilatation of middle cerebral artery (MCA) and an increase of CBF. Potassium ion is considered a mediator that contributes to coupling processes between CBF and neuronal activity.

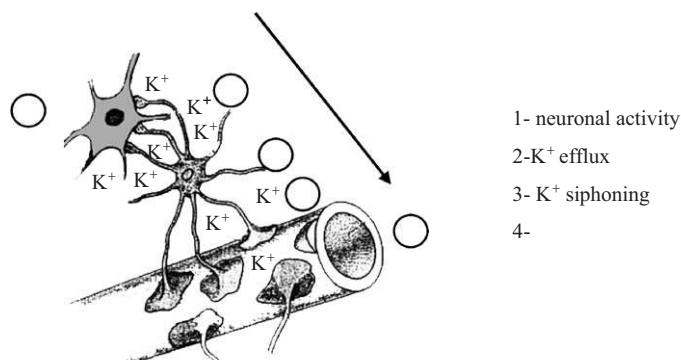
The second vascular mechanism concerns the endothelium-dependent relaxing response to acetylcholine (ACh) via the nitric oxide (NO) pathway. Acetylcholine has a strong vasodilator effect via the endothelium component by a stimulation of the production of NO by endothelial NO synthase activation. NO diffusing to smooth muscle cell induces a vasorelaxation by activation of the soluble guanylate cyclase and the subsequent cGMP production. Last mechanism, myogenic reactivity, is the autoregulation system allowing the cerebral blood flow to protect itself towards the arterial pressure fluctuations.

Cerebral resistance arteries own the property to constrict in response to elevation of blood pressure to prevent a blood flow increase, deleterious to brain.

3. Functional cerebral vascular alterations during ischemia–reperfusion

In the rat model of transient cerebral ischemia induced by intraluminal occlusion of the MCA, the previously described vascular mechanisms are differently affected. Ischemia alone reduces the endothelium-dependent relaxation without any effect on Kir2.x density and its associated K^+ -dependent relaxation and on myogenic reactivity. When reperfusion occurs, a significant reduction of Kir2.x current density is observed together with a reduction of the associated smooth muscle K^+ -dependent relaxation that is not observed after ischemia alone (Marrelli et al., 1998; Pétrault et al., 2004). This reduction of Kir2.x density is positively correlated with the infarct volumes as the decrease of Kir2.x current is proportional to the infarct volume (Bastide et al., 1999). The myogenic reactivity is also lost after I/R, meaning that, in response to increasing pressure, the cerebral vessels are unable to constrict and CBF becomes dependent on mean arterial pressure in a linear fashion. The loss of autoregulation mechanism is known to be responsible of significant tissue damage like blood–brain barrier disruption and edema formation (Cipolla et al., 1997). Moreover, an additional reduction of endothelium-dependent relaxation is observed following reperfusion step (Bastide et al., 2003). All together, these results demonstrate that 24 h after I/R, there is a drastic loss of specific vasodilation and vasoconstriction mechanisms inducing an uncoupling between CBF and neuronal metabolism that could participate to the extension of neuronal lesions. After a period of reperfusion extended to 7 days, a significative spontaneous reduction of striatal volume and edema volume is observed as well as a spontaneous and total recovery of vascular smooth muscle functions (Kir2.x density and its associated K^+ -dependent relaxation and myogenic tone) contrary to endothelium-dependent relaxation that is still impaired (Plaisier et al., 2006).

Beyond the neuroprotective and the vasculoprotective effect of pharmacological treatment, the potential benefit on functional recovery is the final validation of a drug. The evaluation of functional recovery is based on the



performances of ischemic animals to different behavioral tests. Different tests have been developed, among them, the prehensile traction test and the adhesive removal test, that respectively give the degree (according to a score) of the motor and the sensorimotor deficit of the animals. In the prehensile traction test, the evaluation is based on the capacity of the animal to grip with two or four limbs and its tail or to move along the rope (Zausinger et al., 2000). Lower score value implies the higher deficit. In the adhesive removal test, two paper dots are placed on the wrists of animals and the different trials of animals are recorded and evaluated by a score (Schallert et al., 1986). On a 7 days period post-ischemia, ischemic animals obtain very low scores 24 h after ischemia to both behavioral tests demonstrating a significative and severe functional deficit and slowly, throughout the 7 days period, there is a progressive and spontaneous but partial functional recovery.

4. Pharmacological antioxidant modulation of post-ischemic vascular alterations

Different deleterious mechanisms might participate to the installation of vascular impairments since endothelium and smooth muscle are differently affected. The deleterious effect of reperfusion on smooth muscle compartment confirmed by electrophysiological and functional approaches suggests that oxidative stress could be responsible for this impairment. Oxidative damages of cell membranes (lipid peroxidation and protein oxidation) have been shown to impair ion channels and electrical properties of vascular smooth muscle (Kourie, 1998). On the other hand, MCA occlusion alone without reperfusion induces an impairment of endothelium-dependent relaxation in response to ACh suggesting that a more complex pathophysiological mechanism occurs in endothelium cells.

The involvement of oxidative stress in the development of vascular alterations in parallel to cerebral lesions has been tested by the use of pharmacological synthetic antioxidant agents. The dtBC is a synthetic molecule (3',5'-di-*tert*-butylhydroxyphenyl) belonging to flavonoids family, first tested in cardiac ischemia. The other molecule, stobadine, known to scavenge hydroxyl radicals, peroxy- and alkoxy-radicals and to quench singlet oxygen, belongs to pyridindole family (Stolc et al., 1997). At 24 h from reperfusion, both molecules injected at time of reperfusion and 5 h later (intraperitoneally for dt-BC and intravenously for stobadine) induce a significant neuroprotective effect on total, cortical infarcts and edema volumes in parallel to a total prevention of Kir alteration. This neuroprotective effect obtained with dt-BC and stobadine could be explained by the antioxidant properties of both molecules. Beneficial effects of dt-BC were first demonstrated in a model of global cardiac ischemia realized on isolated rat heart (Lebeau et al., 2001). Stobadine neuroprotection has been described in an ischemia model obtained by ligation of both common carotid arteries (Horakova et al., 1991). In parallel to this neuroprotective effect, differential protective effects have been observed on vascular functions. Hence, dt-BC prevented the ischemia/reperfusion-induced decrease of Kir current density and its consecutive decrease of smooth muscle relaxation but had no protective effect on

endothelial relaxation. Stobadine prevented Kir2.x current density reduction as well as endothelium-dependent relaxation impairment but did not induce a protection towards K⁺-dependent relaxation. This last result could be due to a proper adverse effect of the molecule against mechanisms downstream to the Kir2.x activation since on stobadine-treated sham-operated animals a reduction of K⁺-dependent relaxation was observed besides Kir interaction. These results show that oxidative stress plays an essential role in the reduction of Kir2.x current density and K⁺-dependent relaxation probably by a direct action of free radicals on protein channel or membrane lipids but suggest also that oxidative stress alone cannot explain endothelial alterations after I/R. Stobadine protected endothelium against I/R consequences as this molecule endows other properties than antioxidative ones as shown in a model of I/R on aorta, where stobadine has been demonstrated to preserve the structural integrity of the endothelium layer (Franko et al., 1999).

The involvement of another deleterious mechanism, the activation of polymorphonuclear neutrophils, observed in acute cerebral infarction has been investigated on the vascular wall by the induction of neutropenia conditions. A protection of endothelium compartment could be specifically obtained in conditions of pharmacologically induced neutropenia together with a significative reduction of infarct size volume. In contrast, smooth muscle compartment alterations were not influenced by pharmacological neutropenia as proved by the persistence of impairment of myogenic tone and Kir2.x activation-induced relaxation (Pétrault et al., 2005).

Finally, when a low dose of bacterial endotoxin LPS (lipopolysaccharide from *Escherichia coli*) was administered 3 days before rat focal I/R, a reduction of the infarct size induced by a permanent middle cerebral artery occlusion was obtained. This neuroprotective effect was mediated by an increased synthesis of brain antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) when LPS was administered 3 days before I/R (Bordet et al., 2000). With LPS administration, in parallel to a significant neuroprotective effect a total prevention of Kir2.x current density and of its associated K⁺-dependent relaxation was observed. LPS administration also totally protected the endothelium-dependent relaxation. Hence, in parallel to neuroprotection, there is a complete vascular protection following LPS-administration. This beneficial effect of LPS in the vasculature could be related to an increase of endothelial NO synthase expression in the endothelium of cerebral blood vessels and by a decrease of oxidative stress following increase SOD activity (Bastide et al., 2003).

5. From neuro and vasculoprotection to functional recovery improvement

When ischemic/reperfused animals were treated with an antioxidant agent like the previously cited stobadine, the progressive recovery was significantly accelerated compared to vehicle-treated animals even if this recovery was still partial after 7 days. Infarct and edema volumes of stobadine-treated animals were reduced compared to the volumes obtained on vehicle-treated rats at 24 h, 3 and 7

days. This neuroprotection was observed together with totally preserved relaxation functions (total protection of smooth muscle and endothelium relaxations as well as myogenic tone). The maintainance of a high quality of reperfusion in ischemic territory would undoubtedly contribute to reduce motor and sensorimotor deficit (Plaisier et al., 2006).

6. Conclusion

In ischemia/reperfusion animal models, brain and vascular tissues are intrinsically able to slowly repair themselves, at least partially, that discloses their plasticity property. The experimental data reported here point out that involvement of the different compartments of vascular wall in ischemic pathology is complex. Further, they also show that either a pre-ischemic treatment (LPS) or a post-ischemic treatment (dt-BC or stobadine) may interfere with the spontaneous mechanism. An antioxidant treatment (stobadine) is able to induce a neuroprotection with a real benefit in term of functional deficit. These results are corroborated by the recent publication of the results of a clinical trial testing a free-radical trapping, NXY-059, on acute ischemic stroke (Lees et al., 2006). Our experimental results contribute to clarify a possible relationship between vasculoprotective and neuroprotective effect even if further studies with other pharmacological agents will be necessary.

Role of the funding sources

University of Lille 1, USTL (France) contributed with editorial assistance, reviewed drafts of the manuscript and contributed to the decision to submit the manuscript for publication. The authors retained full editorial control and responsibilities throughout the preparation of the manuscripts.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgments

This supplement is based upon the proceedings from Lille Summer School in Neurosciences—Brain Plasticity in Life Span held in France in 2006. The supplement is supported financially by Université of Lille 1, USTL (France), Servier (France) and Nestlé (Switzerland).

This work presented here is supported by Conseil Régional du Nord-Pas de Calais (F.P.) and by Fondation Paul Hamel (O.P.).

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. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 1309–1315.
- Bastide, M., Gelé, P., Pétrault, O., Pu, Q., Caliez, A., Robin, E., Deplanque, D., Duriez, P., Bordet, R., 2003. Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide in parallel to brain ischemic tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23 (4), 399–405.
- Bordet, R., Deplanque, D., Maboudou, P., Puisieux, F., Pu, Q., Robin, E., Martin, A., Bastide, M., Leys, D., Lhermitte, M., Dupuis, B., 2000. Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 1190–1196.
- Cipolla, M.J., McCall, A.L., Lessov, N., Porter, J.M., 1997. Reperfusion decreases myogenic reactivity and alters middle cerebral artery function after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 28, 176–180.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391–397.
- Franco, J., Pomfy, M., Novakova, B., Benes, L., 1999. Stobadine protects against ischemia–reperfusion induced morphological alterations of cerebral microcirculation in dogs. *Life Sci.* 65, 1963–1967.
- Horakova, L., Uraz, V., Ondrejickova, O., Lukovic, L., Juranek, I., 1991. Effect of stobadine on brain lipid peroxidation induced by incomplete ischemia and reperfusion. *Biomed. Biochim. Acta* 50, 1019–1025.
- Kourie, J.I., 1998. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am. J. Physiol.* 275, C16–C24.
- Lebeau, J., Nevière, R., Cotellet, N., 2001. Beneficial effects of different flavonoids, on functional recovery after ischemia and reperfusion in isolated rat heart. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 23–27.
- Lees, K.R., Zivin, J.A., Ashwood, T., Davis, S.M., Diener, H.C., Grotta, J., Lyden, P., Shuaib, A., Härdemark, H.G., Wasiewski, W.W., 2006. NXY-059 for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 354, 588–600.
- Marrelli, S.P., Johnson, T.D., Khorovets, A., Childres, W.F., Bryan, R.M., 1998. Altered function of inward rectifier potassium channels in cerebrovascular smooth muscle after ischemia/reperfusion. *Stroke* 29, 1469–1474.
- Pétrault, O., Bastide, M., Cotellet, N., Gelé, P., Gautier, S., Laprais, M., Vamecq, J., Duriez, P., Bordet, R., 2004. The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivative di-*tert*-butylhydroxyphenyl is parallel to the preventive effect on post-ischemic Kir2.x impairment but not to post-ischemic endothelial dysfunction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 370, 395–403.
- Pétrault, O., Ouk, T., Gautier, S., Laprais, M., Gelé, P., Bastide, M., Bordet, R., 2005. Pharmacological neutropenia prevents endothelial dysfunction but not smooth muscle functions impairment induced by middle cerebral artery occlusion. *Br. J. Pharmacol.* 144, 1051–1058.
- Plaisier, F., Bastide, M., Ouk, T., Pétrault, O., Laprais, M., Descamps, E., Stolc, S., Bordet, R., 2006. Pharmacological potentiation of intrinsic sensorimotor recovery together with neuroprotection and vasculoprotection after cerebral focal ischemia/reperfusion by an antioxidant agent, stobadine. *Fund. Clin. Pharmacol.* 20 (2), 196.
- Schallert, T., Hernandez, T.D., Barth, T.M., 1986. Recovery of function after brain damage: severe and chronic disruption by diazepam. *Brain Res.* 379, 104–111.
- Stolc, S., Vlkolinsky, R., Pavlasek, J., 1997. Neuroprotection by the pyridindole stobadine: a minireview. *Brain Res. Bull.* 42 (5), 335–340.
- Zausinger, S., Hungerhuber, E., Baethmann, A., Reulen, H.J., Schmid-Elsaesser, R., 2000. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res.* 863, 94–105.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Akopov SE, Sercombe R, Seylaz J. Endothelial dysfunction in cerebral vessels following carotid artery infusion of phorbol ester in rabbits: the role of polymorphonuclear leukocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;14:1078-87
- Alexandrov AV, Black SE, Ehrlich LE, Caldwell CB, Norris JW. Predictors of hemorrhagic transformation occurring spontaneously and on anticoagulants in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 1997;28:1198-202
- Amarenco P, Goldstein LB, Callahan A, Sillesen H, Hennerici MG, O'Neill BJ, Rudolph AE, Simunovic L, Zivin JA, Welch KM,; on behalf the SPARCL Investigators. Baseline blood pressure, low-and high-density lipoproteins, and triglycerides and the risk of vascular events in the Stroke Prevention by aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) trial. *Atherosclerosis* 2008 (in press)
- Amarenco P. Hypercholesterolemia, lipid-lowering agents and the risk for brain infarction. *Neurology* 2001;57:S35-S44
- Aoki T, Sumii T, Mori T et al. Blood-brain barrier disruption and matrix métalloprotéinase-9 expression during reperfusion injury : mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 2002;33:271-7
- Armao D, Kornfeld M, Estrada EY et al. Neutral proteases and disruption of the blood-brain barrier in rat. *Brain Res* 1997;767:259-64
- Asahi M, Huang Z, Thomas S, Yoshimura S, Sumii T, Mori T, Qiu J, Amin-Hanjani S, Huang PL, Liao JK, Lo EH, Moskowitz MA. Protective effects of statins involving both eNOS and tPA in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:722-9
- Asahi M, Asahi K, Wang X, Lo EH. Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:452-7
- Ayata C, Ropper AH. Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci* 2002;9:113-24
- Bastide M, Bordet R, Pu Q et al. Relationship between inward rectifier potassium current impairment and brain injury after cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:1309-15
- Bastide M, Gele P, Petrault O et al. Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide in parallel to brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;4:399-405
- Benchoua A, Guegan C, Couriaud C et al. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* 2001;21:7127-34
- Bendayan R, Lee G, Bendayan M. Functional expression and localization of P-glycoprotein at the blood brain barrier. *Microsc Res Tech* 2002;57:366-88
- Beray-Berthat V, Croci N, Plotkine M, Margaill I. Neutrophils do not contribute to infarction, oxidative stress and NO synthase activity in severe brain ischemia. *Exp neurol* 2003;182:446-54

- Beray-Berthat V, Croci N, Plotkine M, Margail I. Polynuclear neutrophil contribute to infarction and oxidant stress in the cortex but not in the striatum after ischemia/reperfusion in rats. *Brain research* 2003;987:32-8
- Berger C, Xia F, Maurer MH, Schwab S. Neuroprotection by pravastatin in acute ischemic stroke in rats. *Brain Research Reviews* 2008;58:48-56.
- 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
- Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2000;129:823-34
- Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J Neurosci* 2001 ; 21(13) : 4668-77
- Bordet R, Deplanque D, Maboudou P et al. Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1190-6
- Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 1977;78:67-82
- Broderick JP. On the behalf of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke rtPA stroke study group. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. *Stroke* 1997;28:2109-18
- Bruemmer D, Blaschke F, Law RE. New targets for PPARgamma in the vessel wall : implications for restenosis. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:S26-S30
- Buck BH ,Liebskind DS, Saver JL et al. Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke. *Stroke* 2008;39:355-60
- Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:52-7
- Caplan LR. Hemorrhage into embolic brain infarcts. *Pharmacotherapy* 1999;19:125-7
- Castellanos M, Leira R, Serena J et al. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke* 2003;34:40-6
- Chen H, Chopp M, Zhang R, Bodzin G, Chen Q, Rusche J, Todd R. Anti-CD11b monoclonal antibody reduces ischemic cell damage after transient focal cerebral ischemia in rat. *Ann Neurol* 1994;25:458-63
- Chen H, Chopp M, Bodzin G. Neutropenia reduces the volume of cerebral infarct after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurosci Res Commun* 1992;11:93-9
- Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator –activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 25573-80

- Chopp M, Li N, Jiang N, Zhang R, Probst J. Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:578-84
- Chu K, Lee ST, Koo JS, Jung KH, Kim EH, Sinn DI, Kim JM, Ko SY, Kim SJ, Song EC, Kim M, Roh JK. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-agonist, rosiglitazone, promotes angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2006;1093:208-18
- Chung HK, Lee IK, Kang H, Suh JM, Kim H, Park KC, Kim DW, Ro KH, Shong M. Statin inhibits interferon-gamma-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Exp Mol Med* 2002;34:451-61
- Cipolla MJ, Curry AB. Middle cerebral artery function after stroke : the threshold duration of reperfusion for myogenic activity. *Stroke* 2002;33(8):2094-9
- Cipolla MJ, Lessov N, Clark WM. Post ischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator. *Stroke* 2000;31:940-5
- Cipolla MJ, McCall AL, Lessov N, Porter JM. Reperfusion decreases myogenic reactivity and alters middle cerebral artery function after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1997;28:176-80
- Cipolla MJ, Osol G. Vascular smooth muscle actin cytoskeleton in cerebral artery forced dilatation. *Stroke* 1998;29:1-6
- Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Benetti E, Gallicchio M, Dianzani C, Danni O, Thiemermann C, Fantozzi R. Oxidative stress and inflammatory response evoked by transient cerebral ischemia/reperfusion: effects of the PPAR-alpha agonist WY14643. *Free Radic Biol Med* 2006;41:579-89
- Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, Danni O, Thiemermann C, Fantozzi R. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2006b;530:70-80
- Connolly EC, Winfree T, Springer Y, Naka H, Liao H, Yan D, Stern R, Solomon JC, Gutierrez-Ramos, Pinsky D. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion : role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 1996;97:209-16
- Cuadrado E, Ortega L, Hernández-Guillamon M, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Rosell A, Montaner J. Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol* 2008;84:207-14
- Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S et al. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem* 1998;70:1366-75
- Culman J, Zhao Y, Gohlke Herdegen T. PPAR- γ : therapeutic target for ischemic stroke. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28:244-9
- Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, et al. Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol* 1996;135:467-510

- Del Zoppo GJ. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 2008 (*in press*)
- Del Zoppo GJ. Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med* 2006;354:553-5
- Del Zoppo GJ, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:879-94
- Del Zoppo GJ, Hallenbeck JM. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res* 2000;98:V73-V81
- Del Zoppo GJ, Von Kummer R, Hamann GF. Ischaemic damage of brain microvessels : inherent risks for thrombolytic treatment in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:1-9
- Del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E et al. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1991;22:1276-84
- Del Zoppo GJ, Copeland BR, Anderchek K et al. Hemorrhagic transformation following tissue plasminogen activator in experimental cerebral infarction. *Stroke* 1990;21:596-601
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S et al. PPARalpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-κB and AP-1. *J Bio. Chem* 1999b;274:32048-54
- Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 1999;85:394-402
- Deplanque D, Masse I, Lefebvre C, Libersa C, Leys D, Bordet R. Prior TIA, lipid-lowering drug use, and physical activity decrease ischemic stroke severity. *Neurology* 2006;67:1403-10
- Deplanque D, Gele P, Petrault O et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. *J Neurosci* 2003;23:6264-71
- Deshmukh VR, Fiorella DJ, Albuquerque FC et al. Intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke : Preliminary experience with platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors as adjunctive therapy. *Neurosurgery* 2005;56:46-55
- Didion S, Ryan M, Didion L, Fegan P, Sigmund C, Faraci F. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res* 2002;91:938-44
- Dijkhuizen RM, Asahi M, Wu O et al. Rapid breakdown of microvascular barriers and subsequent hemorrhagic transformation after delayed recombinant tissue plasminogen activator treatment in a rat embolic stroke model. *Stroke* 2002;33:2100-4
- Dijkhuizen RM, Asahi M, Wu O et al. Delayed rtPA treatment in a rat embolic stroke model : diagnosis and prognosis of ischemic injury and hemorrhagic transformation with magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:964-71
- Ding G, Jiang Q, Li L, Zhang L, Zhang ZG, Panda S, Ewing JR, Chopp M. MRI of combination treatment of embolic stroke in rat with rtPA and atorvastatin. *J Neurol Sci* 2006;246:139-47

- Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003;25:248-54
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke : an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22:391-7
- Donnan GA, Dewey HM, Davis SM. Stroke. *Lancet* 2008;371:1612-23.
- Endres M, Engelhardt B, Kostinaho J, Lindvall O, Meairs S, Mohr JP, Planas A, Rothwell N, Schwaninger M, Schwab ME, Vivien D, Wieloch T, Dirnagl U. Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis* 2008;25:268-78
- Endres M. Statins and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:1093-110
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:8880-5
- Fagan S, Hess DC, Hohnadel EJ et al. Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke* 2004;35:2220-5
- Feuerstein GZ, Zaleska MM, Krams MM, Wang X, Day M, Rutkowski JL, Finkelshtein SP, Pangalos MN, Poole, M, Stiles GL, Ruffolo RR, Walsh FL. Missing steps in the STAIR case : a translational medicine perspective on the development of NXY-059 for treatment of acute ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:217-9
- Ford GA. Clinical pharmacological issues in the development of acute stroke therapies. *Br J Pharmacol* 2008;153:112-9
- Frijns CJM, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2002;33:2115-22
- Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T et al. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke* 2004;35:998-1004
- Gasche Y, Copin J.C. Physiopathologie de la barrière hématoencéphalique et œdème cérébral d'origine ischémique. *Ann Fr Anesth Reanim* 2003;22:312-9
- Gautier S, Petruault O, Gele P, Laprais M, Bastide M, Bauters A, Deplanque D, Jude B, Caron J, Bordet R. Involvement of thrombolysis in recombinant tissue plasminogen activator-induced cerebral hemorrhages and effect on infarct volume and postischemic endothelial function. *Stroke* 2003;34:2975-9
- Gavins F, Yilmaz G, Granger DN. The evolving paradigm for blood cell-endothelial cell interactions in the cerebral microcirculation. *Microcirculation* 2007; 14:667-81.
- Gertz K, Laufs U, Lindbauer U, Nickenig G, Böhm M, Dirnagl U, Endres M. Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke* 2003 ;34:551-7
- Gidday JM, Gasche YG, Copin JC et al. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 289:H558-68

- Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke for ischemic stroke : Past, present and future. *Neuropharmacology* 2008;39:1556-62
- Goya K, Sumitani S, XU X et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:658-63
- Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:99-109
- Green AR. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke : reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *Br J Pharmacol* 2008;153:S325-38
- Green AR and Shuaib A. Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug Discov Today* 2006;11:681-93
- Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide : pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995;57:737-69
- Gurwitz JH, Gore JM, Goldberg RJ et al. Risk for intracranial hemorrhage after tissue plasminogen activator treatment for acute myocardial infarction. *Ann Intern Med* 1998;8:597-604
- 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
- Hawaleshka A, Jacobsohn E. Ischaemic preconditioning : mechanisms and potential clinical applications. *Can J Anaesth* 1998;45(7):670-82
- Hossman KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994 ;36 :557-65
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 2006;66(3):232-45
- Iadecola C, Salkowski CA, Zhang F et al. The transcription factor interferon regulatory factor 1 is expressed after cerebral ischemia and contributes to ischemic brain injury. *J Exp Med* 1999;189:719-27
- 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
- Ishikawa M, Vowinkel T, Stokes KY, et al. CD40/CD40 ligand signaling in mouse cerebral microvasculature after focal ischemia/reperfusion. *Circulation* 2005 111:1690-6
- Ishikawa M, Sekizuka E, Sato S et al. Effects of moderate hypothermia on leukocyte-endothelium interaction in the rat pial microvasculature after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1999;30:1679-86

- Jackson SM, Parhami F, Xi XP, Berliner JA, Hsueh WA, Law RE, Demer LL. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2094-104
- Jasinska M, Owczarek J, Orszulok-Michalak. Statins : a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep* 2007;59:483-99
- Ji S, Kronenberg G, Balkaya M, Färber K, Gertz K, Kettenmann H, Endres M. Acute neuroprotection by pioglitazone after mild brain ischemia without effect on long-term outcome. *Exp Neurol (in press)*
- Jiang Y, Wu J, Hua Y et al. Thrombin-receptor activation and thrombin-induced brain tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22(4):404-10
- Justicia C, Panes J, Sole S et al : Neutrophil infiltration increases matrix métalloprotéinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb. Blood Flow Metab* 2003;23:1430-40
- Kahles T, Foerch C, Sitzler M, Schroeter M, Steinmeitz H, Rami A, Neumann-Haefelin T. Tissue plasminogen activator mediated blood-brain barrier damage in transient focal cerebral ischemia in rats: relevance of interactions between thrombotic material and thrombolytic agent. *Vasc Pharmacol* 2005;43:254-9
- Katsura K, Kristian T, Siesjö BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 1994;22: 991-6
- Kawashima S, Yamashita T, Miwa Y, Ozaki M, Namiki M, Hirase T, Inoue N, Hirata K, Yokoyama M. HMG-CoA reductase inhibitor has protective effects against stroke events in Stroke-Prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 2003;34:157-63
- Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993;23(1):21-48
- Kent DM, Price LL, Ringleb P et al. Sex-based differences in response to recombinant tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke: a pooled analysis of randomized clinical trials. *Stroke* 2005;36:62-5
- Kilic E, Böhr M, Humann D. Effects of recombinant tissue plasminogen activator after intraluminal thread occlusion in mice. *Stroke* 2001;32:2641-7
- Kilic E, Kilic U, Matter CM, Lüscher TF, Bassetti CL, Hermann DM. Aggravation of focal cerebral ischemia by tissue plasminogen activator is reversed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor but does not depend on endothelial NO synthase. *Stroke* 2005;36:332-6
- Kilic U, Bassetti CL, Kilic E, Xing H, Wang Z, Hermann DM. Post-ischemic delivery of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor rosuvastatin protects against focal cerebral ischemia in mice via inhibition of extracellular-regulated kinase-1/-2. *Neuroscience* 2005b;134:901-6
- Klose D, Laprais M, Leroux V, Siepmann, Deprez B, Bordet R, Siepmann J. Fenofibrate loaded PLGA microparticles : effects on ischemic stroke. *Eur J Pharma Sci (in press)*

- Knight RA, Barker PB, Fagan SC et al. Prediction of impending hemorrhagic transformation in ischemic stroke using magnetic resonance imaging in rats. *Stroke* 1998;29:144-51
- Koh KK. Effects of statins on vascular wall : vasomotor function, inflammation and plaque stability. *Cardiovasc Res* 2000;47:648-57
- Kobayashi S, Harris VA, Welsh FA. Spreading depression induces tolerance of cortical neurons to ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15(5):721-7
- Kristiàn T, Siesjö BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 1998;29:705-18
- Kurosaki R, Muramatsu Y, Kato H, Araki T. Protective effect of pitavastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, on ischemia-induced neuronal damage. *Neurol Res* 2004;26:684-91
- Lapchak PA, Araujo DM, Song D et al. The nonpeptide glycoprotein IIb/IIIa platelet receptor antagonist SM-20302 Reduces tissue plasminogen activator-induced intracerebral hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 2002;33:147-52
- Lapchak PA, Araujo DM. Reducing bleeding complications after thrombolytic therapy for stroke : clinical potential of métalloprotéinase inhibitors and spin trap agents. *CNS Drugs* 2001;15:819-29
- Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Métalloprotéinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 2000;31:3034-40
- Larrue V, von Kummer RR, Muller A, Bluhmki E. Risk factors for severe hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: a secondary analysis of the European-Australasian Acute Stroke Study (ECASS II). *Stroke* 2001;32:438-41
- Larrue V, Von Kummer R, del Zoppo G, Bluhmki E. Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke : potential contributing factors in the European Cooperative Acute Stroke Study. *Stroke* 1997;28:957-60
- Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J, Remmel KS, Jauch EC; Brain study group. Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke : the Biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN). *Stroke* 2009;40:77-85
- Laude K, Richard V, Thuillez C. Coronary endothelial cells : a target of ischemia reperfusion and its treatment ? *Arch Mal Cœur Vaiss* 2004;97:250-54
- Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Böhm M, Nickenig G, Endres M. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Research* 2002;942:23-30
- Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Böhm M, Dirnagl U, Endres M. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 2000;31:2437-49
- Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998;273:24266-71

- Law RE, Hsueh WA. PPAR- γ and atherosclerosis : effects on cell growth and movement. *Arteriocler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1891-5
- Lee JM, Grabb M, Zipfel G et al. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 2000;106:723-31
- Lee KJ, Jang YH, Lee H, Yoo HS, Lee SR. PPAR γ agonist pioglitazone rescue neuronal cell damage after transient global cerebral ischemia through matrix metalloproteinase inhibition. *Eur J Neurosci* 2008; 27:334-42
- Lee WS, Kwon YJ, Rhim BY et al. Disturbances in autoregulatory responses of rat pial arteries by sulfonyleureas. *Life Sci* 1993;52:1527-34
- Leist M, Nicotera P. Apoptosis, excitotoxicity and neuropathology. *Exp Cell Res* 1998;239:183-201
- Levy DE, Brott TG, Haley C et al. Factors related to intracranial hematoma formation in patients receiving tissue-type plasminogen activator for acute ischemic stroke. *Stroke* 1994;25:291-7
- Leys D, Deplanque D, Mounier-Vehier C et al. Stroke prevention : management of modifiable vascular risk factors. *J Neurol* 2002;249:507-17
- Lin TN, He YY, Wu g et al. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke* 1993;24:117-21
- Lindsberg PJ, Carpen O, Paetau A et al. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation* 1996;94:939-45
- Lindsberg PJ, Hallenbeck JM, Feuerstein G. Platelet-activating factor in stroke and brain injury. *Ann Neurol* 1991;30:117-29
- Lo EH. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br J Pharmacol* 2008;153:S396-405
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanism and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:399-415
- Lok J, Gupta P, Guo S, Kim WJ, Whalen MJ, van Leyden K, Lo EH. Cell-Cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res* 2007;32:2032-45
- Lopez-Atalaya JP, Roussel BD, Ali C, Maubert E, Petersen KU, Berezowski V, Cecchelli R, Orset C, Vivien D. Recombinant Desmodus rotundus salivary plasminogen activator crosses the blood-brain-barrier through a low-density lipoprotein receptor-related-protein-dependent mechanism without exerting neurotoxic effects. *Stroke* 2007;30:1036-43
- Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathology* 1999;9:119-31
- Luo Y, Yin W, Signore AP, Zhang F, Hong Z, Wang S, Graham SH, Chen J. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *J Neurochem* 2006;97:435-48

- Marler JR on the behalf of the National Institute of Neurological Disorders and stroke rtPa study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995;333:1581-7
- Martinez-Revelles S, Jimenez-Altayo F, Caracuel L, Perez-Asensio FJ, Plana AM, Vila E. Endothelial dysfunction in rat mesenteric resistance artery after transient middle cerebral artery occlusion. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 325:3363-9
- Marx N, Sukhova GK, Collins T, et al. PPAR α activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 1999;99:3125-31
- Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke* 1994;25:1469-75
- Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Shozuhara M, Nimoya T, Kihara T, Tamatani T, Miyasaka M, Kogure K. Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res* 1994;25:1469-75
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA. Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 1993;4:709-11
- Minnerup J, Heidrich J, Wellmann J, Rogalewski A, Schneider A, Schäbitz WR. Meta-analysis of the efficacy of granulocyte-colony stimulating factor in animal models of focal cerebral ischemia. *Stroke* 2008;39:1855-61
- Montaner J, Molina CA, Monasterio J et al. Matrix métalloprotéinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 2003;107:598-603
- Montrucchio G, Lupia E, De Martino A et al. Plasmin promotes an endothelium-dependant adhesion of neutrophils. *Circulation* 1996;93:2152-60
- Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006;110:371-85
- Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 2004;123:131-45
- Muramatsu Y, Kurosaki R, Kato H, Araki T. Effect of pitavastatin against S100 β protein in the gerbil hippocampus after transient cerebral ischaemia. *Acta Physiol Scand* 2004;182:95-107
- Murata Y, Rosell A, Scannevin RH, Rhodes KJ, Wang X, Lo EH. Extension of the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke. *Stroke* 2008;39:3337-7
- Nedergaard M, Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* 2005;50:281-6
- Neviere R, Guery B, Mordon S et al. Inhaled NO reduces leukocyte-endothelial cell interactions and myocardial dysfunction in endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1783-90
- Neumann-Haefelin C, Brinker G, Uhlenküken U et al. Prediction of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy of clot embolism. An MRI investigation in rat brain. *Stroke* 2002;33:1392-8

- Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med* 2000;36:483-506
- 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
- Okouchi M, Okayama N, Omi H, Imaeda K, Shimizu M, Fukutomi T, Itoh M. Cerivastatin ameliorates high insulin-enhanced neutrophil-endothelial cell adhesion and endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibiting mitogen-activated protein kinase activation. *J Diabetes Its Complicat* 2003;17:380-6
- O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B : a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 1997;20:252-8
- Ou Z, Zhao X, Labiche LA, Strong R, Grotta JC, Herrmann O, Aronowski J. Neuronal expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) and 15d-prostaglandin J2--mediated protection of brain after experimental cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 2006;1096:196-203
- Panickar KS, Norenberg MD. Astrocytes in cerebral ischemic injury : morphological and general considerations. *Glia* 2005;50:287-98
- Park HK, Chu K, Lee ST, Jung KH, Kim EH, Lee KB, Song YM, Jeong SW, Kim M, Roh JK. Granulocyte colony-stimulating factor induces sensorimotor recovery in intracerebral hemorrhage. *Brain Res* 2005; 1041:125-31
- Patzer A, Zhao Y, Stöck I, Gohicke P, Herdegen T, Culman J. Peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) differently modulate the interleukin-6 expression in the peri-infarct cortical tissue in the acute and delayed phases of cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci* 2008; 28:1786-94
- Paumelle R and Staels B. Cross-talk between statins and PPAR- α in cardiovascular diseases : clinical evidence and basic mechanisms. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:73-8
- Pereira MP, Hurtado O, Cárdenas A, Alonso-Escolano D, Boscá L, Vivancos J, Nombela F, Leza JC, Lorenzo P, Lizasoain I, Moro MA. The nonthiazolidinedione PPARgamma agonist L-796,449 is neuroprotective in experimental stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:797-805
- Pétrault O, Ouk T, Gautier S, Bastide M, Bordet R. La paroi vasculaire : une cible pour la protection cérébrale au cours de l'ischémie cérébrale. *La Lettre du Pharmacologue* 2007;21:88-97
- Petrault O, Bastide M, Cotellet N, Gele P, Gautier S, Laprais M, Vamecq J, Duriez P, Bordet R. The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivate di-tert-butylhydroxyphenyl is parallel to the preventive effect on post-ischemic Kir2.x impairment but not to post-ischemic endothelial dysfunction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;370:395-403
- Planas AM, Soriano MA, Berruezo M et al. Induction of Stat3, a signal transducer and transcription factor, in reactive microglia following transient focal cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci* 1996;8:2612-18

- Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor α activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor- κ B signalling and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem* 1998;273:32833-41
- Prestigiacomo CJ, Kim SC, Conolly ES, Liao H, Yan SF, Pinsky DJ. CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. *Stroke* 1999;30:110-7
- Prinz V, Laufs U, Gertz K, Kronenberg G, Balkaya M, Leithner C, Lindauer U, Endres M. Intravenous rosuvastatin for acute stroke treatment. An animal study. *Stroke* 2008;39:433-8
- Rejdak R, Rejdak K, Sieklucka-Dziuba M, Stelmasiak Z, Grieb P. Brain tolerance and preconditioning. *Pol J Pharmacol* 2001;53(1):73-9
- Ribo M, Montaner J, Molina CA et al. Admission fibrinolytic profile is associated with symptomatic hemorrhagic transformation in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke* 2004;35:2123-7
- Ringleb PA, Schellinger PD, Schranz C, Hacke W. Thrombolytic therapy within 3 to 6 hours after onset of ischemic stroke : useful or harmful ? *Stroke* 2002;33:1437-41
- Ritter LS, Orozco JA, Coull BM, McDonagh PF, Rosenblum WI. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke. *Stroke* 2000;31:1153-61
- Ritter LS, McDonagh PF. Low flow reperfusion after myocardial ischemia enhances leukocyte accumulation in coronary microcirculation. *Am J Physiol* 1997;273:H1154-65
- Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamon M, Lo EH, Montaner J. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 2008;39:1121-6
- Rosenblum WI, Wormley B. Selective depression of endothelium-dependent dilations during cerebral ischemia. *Stroke* 1995;26:1877-81
- Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G et al. Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* 1998;254:117-20
- Sanossian N and Ovbiagele. Drug insight : translating evidence on statin therapy into clinical benefits. *Nat Clin Pract Neurol* 2008;4:43-9
- Schmidt A, Goepfert C, Feistma K, Buddecke E. Lovastatin-stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF- α activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2002;164:57-64
- Shabanzadeh AP, Shuaib A, Wang CX. Simvastatin reduced ischemic brain injury and perfusion deficits in an embolic model of stroke. *Brain Research* 2005;1042:1-5

- Shimakura A, Kamanaka Y, Ikeda K, Kondo Y, Suzuki Y, Umemura K. Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 2000;858:55-60
- Shimazu T, Inoue I, Araki N, Asano Y, Sawada M, Furuya D, Nagoya H, Greenberg JH. A peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist reduces infarct size in transient but not in permanent ischemia. *Stroke* 2005;36:353-9
- Sims NR, Anderson MF. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. *Neurochem Int* 2002;40:511-26
- Sironi L, Banfi C, Brioshi M, Gelosa P, Guerrini U, Nobili E, Gianella A, Paoletti R, Tremoli E, Cimino M. Activation of NF- κ B and ERK1/2 after permanent focal ischemia is abolished by simvastatin treatment. *Neurobiol Dis* 2005;22:445-51
- Sironi L, Cimino M, Guerrini U, Cavio AM, Lodetti B, Adsente M, Balduini W, Paoletti R, Tremoli E. Treatment with statins after induction of focal ischemia in rats reduces the extent of brain damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:322-7
- Sobey CG, Faraci FM. Effects of a novel inhibitor of guanylyl cyclase on dilator responses of mouse cerebral arterioles. *Stroke* 1997;28:837-42
- Staels B, Koenig W, Habib A, et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 1998;393:790-3
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain. *Prog Neurobiol* 1998;56:149-71
- Stone TW, Addae JJ. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. *Eur J Pharmacol* 2002;447:285-96
- Sugiura S, Yagita Y, Sasaki T, Todo K, Terasaki Y, Ohyama N, Hori M, Kitagawa K. Postischemic administration of HMG-CoA reductase inhibitor inhibits infarct expansion after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 2007;1181:125-9
- Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 2002;33:831-6
- Sundararajan S, Gamboa JL, Victor NA, Wanderi EW, Lust WD, Landreth GE. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia. *Neuroscience* 2005;30:685-96
- Tanne D, Kasner SE, Demchuk AM et al. Markers of increased risk of intracerebral hemorrhage after intravenous recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute ischemic stroke in clinical practice: the Multicenter rt-PA Stroke Survey. *Circulation* 2002;105:1679-85
- Tong DC, Adami A, Moseley ME, Marks MP. Prediction of hemorrhagic transformation following acute stroke : role of diffusion- and perfusion-weighted magnetic resonance imaging. *Arch Neurol* 2001;58:587-93
- Tong DC, Adami A, Moseley ME, Marks MP. Relationship between apparent diffusion coefficient and subsequent hemorrhagic transformation following acute ischemic stroke. *Stroke* 2000;31:2378-84

- Touyz, RM and Shiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. *Vascul pharmacol* 2006;45:19-28
- Trendelenburg G and Dirnagl U. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia : focus on ischemic preconditioning. *Glia* 2005;51:307-20
- Trinki A, Vosko MR, Wunderlich N, Dichgans M, Hamann GF. Pravastatin reduces microvascular basal lamina damage following focal cerebral ischemia and reperfusion. *Eur J Neurosci* 2006;24:520-6
- Tureyen K, Kapadia R, Bowen KK, Satriotomo I, Liang J, Feinstein DL, Vemuganti R. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents. *J Neurochem* 2007;101:41-56
- Victor NA, Wanderi EW, Gamboa J, Zhao X, Aronowski J, Deininger K, Lust WD, Landreth GE, Sundararajan S. Altered PPARgamma expression and activation after transient focal ischemia in rats. *Eur J Neurosci* 2006;24:1653-63
- Vivien D, Buisson A. Serine protease inhibitors : novel therapeutic targets for stroke ? *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:755-64
- Wang Q, Tang NX, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 2007;184:53-68
- Wardlaw JM. Overview of Cochrane thrombolysis meta-analysis. *Neurology* 2001;57:S69-S76
- Wegener S, Gottshack B, Jovanovic V, Knab R, Fiebach JB, Schelinger PD, Kucinski T, Jungehulsing GJ, Brunecker P, Muller B, Banasik A, Amberger N, Wernecke KD, Siebler M, Rother J, Villringer A, Weih M; MRI in acute stroke study Group of the german competence network stroke. Transient ischemic attacks before ischemic stroke : preconditioning the human brain ? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* 2004;35:616-21
- Wiegand F, Liao W, Busch C et al. Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999 ; 19(11) : 1229-1237
- Xue SM, Del Bigio MR. Acute tissue damage after injections of thrombin and plasmin into rat striatum. *Stroke* 2001;32:2164-9
- Yrjänheikki J, Koistinaho J, Kettunen M, Kauppinen RA, Appe K, Hüll M, Fiebich BL. Long-term protective effect of atorvastatin in permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2005;1052:174-9
- Zea-Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20:84-91
- Zhang L, Zhang GZ, Ding GL, Jiang Q, Liu X, Meng H, Hozeska A, Zhang C, Li L, Morris D, Zhang RL, Lu M, Chopp M. Multitargeted effects of statin-enhanced thrombolytic therapy for stroke with recombinant human tissue-type plasminogen activator in the rat. *Circulation* 2005;112:3486-94
- Zhang Z, Chopp M, Goussev A, Powers C. Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1998;784:210-7

- Zhao Y, Patzer A, Herdegen T, Gohlke P, Culman J. Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats. *FASEB J* 2006;20:1162-75
- Zhao Y, Patzer A, Gohlke P, Herdegen T, Culman J. The intracerebral application of the PPARgamma-ligand pioglitazone confers neuroprotection against focal ischaemia in the rat brain. *Eur J Neurosci* 2005;22:278-82
- Zhao BQ, Suzuki Y, Kondo K et al. Combination of a free radical scavenger and heparin reduces cerebral hemorrhage after heparin treatment in a rabbit middle cerebral artery occlusion model. *Stroke* 2001;32:2157-63

Résumé :

A la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux, les stratégies thérapeutiques reposent sur l'utilisation d'agents fibrinolytiques dont l'utilisation est limitée par une fenêtre thérapeutique étroite en raison du risque d'hémorragies intra-cérébrales lié à des altérations vasculaires et parenchymateuses. Cette approche fibrinolytique nécessiterait d'être complétée par une double protection de la paroi vasculaire et du parenchyme cérébral. Au sein de l'unité neurovasculaire, les leucocytes, et particulièrement les polynucléaires neutrophiles, jouent un rôle important dans l'inflammation, tant vasculaire que parenchymateuse qui conduit aux lésions cérébrales. Ce travail a pour objectif de déterminer si dans un modèle d'ischémie cérébrale la modulation des interactions leucocytes-endothélium pourrait représenter une cible pertinente : (i) pour diminuer les conséquences lésionnelles de l'ischémie ; (ii) limiter le risque de complications hémorragiques de la thrombolyse. Ceci s'est fait par une double approche pharmacologique : (i) une modulation directe des polynucléaires neutrophiles ; (ii) une modulation des interactions par l'activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha. Dans un premier temps, nos résultats suggèrent une contribution importante des leucocytes dans les altérations vasculaires post-ischémiques ainsi que dans la survenue des complications hémorragiques induites par la fibrinolyse. Dans la deuxième partie de notre travail, l'activation des récepteurs nucléaires PPAR-alpha prévient les altérations endothéliales vasculaires post-ischémiques parallèlement à un effet neuroprotecteur. Ces effets étaient associés à une diminution des complications hémorragiques et du recrutement leucocytaire au sein du foyer ischémique. En conclusion, la protection neurovasculaire après une ischémie cérébrale suivie ou non d'une fibrinolyse apparaît comme une cible intéressante susceptible de prévenir la maturation de l'ischémie cérébrale et les complications hémorragiques. Les récepteurs nucléaires PPAR-alpha représentent expérimentalement une stratégie thérapeutique potentielle de protection de la paroi vasculaire et du tissu cérébral en modulant les interactions leucocytes-endothélium.

**Cerebral ischemia and leukocyte-endothelium interactions : pharmacological modulation
by nuclear receptors PPARs**

Abstract :

In the acute phase of the cerebral ischemia, the therapeutic strategies rest on the use of fibrinolytic agents of which the use is limited by a narrow therapeutic window because of the risk of intracerebral hemorrhages related to vascular and parenchymatous impairments. This fibrinolytic approach would require to be supplemented by a double protection of the vascular wall and cerebral parenchyma. Within the neurovascular unit, the leukocytes, and particularly the polymorphonuclear neutrophils, play an important role in the inflammation, as well vascular as parenchymatous which leads to the cerebral lesions. This work aims to determine in a model of cerebral ischemia if the modulation of the interactions leukocyte-endothelium could represent a relevant target: (i) to decrease the lesional consequences of ischemia; (ii) to limit the risk of hemorrhagic complications of the thrombolysis. This was done by a double pharmacological approach: (i) a direct modulation of polymorphonuclear neutrophils; (ii) a modulation of the interactions by the activation of the nuclear receptors PPAR-alpha. Initially, our results suggest an important contribution of the leukocytes in post-ischemic vascular impairments as well as in the occurrence of the hemorrhagic complications induced by fibrinolysis. In the second part of our work, the activation of the nuclear receptors PPAR-alpha prevents post-ischemic vascular endothelial impairment in parallel to a neuroprotective effect. These effects were associated with a reduction of the hemorrhagic complications and leukocytes recruitment within the ischemic tissue. In conclusion, the neurovascular protection after cerebral ischemia followed or not by fibrinolysis seems an interesting target likely to prevent the maturation of cerebral ischemia and the hemorrhagic complications. The nuclear receptors PPAR-alpha represent a potential therapeutic strategy of protection of the vascular wall and cerebral tissue by modulating the interactions leukocyte-endothelium.

Discipline : Pharmacologie

Mots-clés : ischémie cérébrale, paroi vasculaire, endothélium, leucocytes, polynucléaires neutrophiles, Peroxysome Proliferator-activated receptor, fibrinolyse, rtPA, complications hémorragiques

Adresse : EA 1046, Département de Pharmacologie Hospitalière, 1 Place de Verdun, 59 045 Lille Cedex
