



Intérêt des approches pléiotropes dans l'ischémie cérébrale : modulation pharmacologique par l'atorvastatine

Camille Potey

► To cite this version:

Camille Potey. Intérêt des approches pléiotropes dans l'ischémie cérébrale : modulation pharmacologique par l'atorvastatine. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S014 . tel-01141759

HAL Id: tel-01141759

<https://theses.hal.science/tel-01141759>

Submitted on 13 Apr 2015

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.

Université Lille – Nord de France

Faculté de Médecine

Année 2013

N° _____

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE – NORD DE FRANCE

Discipline : Pharmacologie

Présentée par

Camille Potey

**Intérêt des approches pléiotropes dans l'ischémie cérébrale :
modulation pharmacologique par l'atorvastatine**

Directeur de Thèse : Régis Bordet

Soutenue le 11 octobre 2013

JURY

Catherine Marchand-Leroux

Rapporteur

Atul Pathak

Rapporteur

Vincent Bérézowski

Examineur

Claire Lafay-Chebassier

Examineur

Sophie Gautier

Examineur

Régis Bordet

Directeur de Thèse

A mes parents,

A mes frères et sœur,

A ma « deuxième famille » Isa et Jean-Lou,

Alexandre et Aurélien,

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Pharmacologie Médicale, au sein de l'équipe d'accueil EA1046, sous la direction du Professeur Régis Bordet. Il a été co-encadré par le Docteur Sophie Gautier.

A Madame le Professeur Catherine Marchand-Leroux,

Vous me faites l'honneur d'être rapporteur de ce travail auquel vous êtes associée de longue date. Vous avez été témoin de ses débuts en Master 2, et vous avez contribué à son avancement par votre participation active et bénéfique au Comité de Suivi de Thèse.

Soyez assurée de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Atul Pathak,

Vous me faites l'honneur d'accepter de faire partie de ce jury de thèse et de juger ce travail.

Soyez assuré de ma gratitude et de mes sincères remerciements.

A Madame le Docteur Claire Lafay-Chebassier,

Vous me faites l'honneur d'accepter de faire partie de ce jury de thèse et d'examiner ce travail.

Soyez assurée de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Vincent Bérézowski,

Je te remercie d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail, dont tu as pu suivre l'évolution en Comité de Suivi de Thèse. Tes conseils et critiques, toujours constructives, m'ont été d'une aide précieuse.

Sois assuré de mon respect et de ma reconnaissance sincère.

Régis,

Je vous remercie d'avoir accepté de m'accueillir au sein de l'EA1046 et d'encadrer ce travail de thèse. Merci de votre confiance et de vos conseils précieux qui m'ont permis d'évoluer à la fois professionnellement et humainement.

Soyez assuré de mon profond respect et de ma reconnaissance.

Sophie,

Sans ton aide et tes conseils pour mener à bien ce travail, je ne serai pas là aujourd'hui. A tes côtés j'ai énormément appris. Merci de ta rigueur, de ta patience, de ton soutien et de ta confiance qui m'ont permis de progresser pendant ces trois années de thèse.

Sois assurée de mon profond respect et de ma reconnaissance.

Aux super Pétrault Maud et Olive, à Thav,

Vous avez été en première ligne dans la réalisation de ce travail, je ne trouve d'ailleurs pas de qualificatif satisfaisant pour décrire l'aide aussi bien méthodologique que technique que vous m'avez apportée. Sans vous, l'avancement de ce travail aurait été bien plus difficile, et aurait sans aucun doute eu lieu dans une ambiance moins agréable... MERCI !

A Monsieur le Professeur Caron,

Pour moi, tout a commencé au CRPV. Votre rencontre, tout comme celle de Sophie et Régis, a été déterminante pour moi. Je vous remercie de vos conseils précieux et de votre écoute. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

A l'équipe du laboratoire de Pharmacologie : Adeline, Aude, Bérangère, Bruce, Charlotte, Christian, David, Dominique, Emilie, JC, Julie, Kevin, Michèle, Nadine, Patrick, Yao,

Pour m'avoir appris justement à travailler en équipe et dans la bonne humeur, pour votre disponibilité et votre patience face à mes (nombreuses) questions et problèmes techniques parfois exotiques, je vous remercie !

A toute l'équipe du CRPV : Monsieur Caron et Sophie, mais également Jackie, Joëlle, les internes rencontrés lors de ces trois années de thèse et d'assistantat, et une mention spéciale à Johana et Marine (vous avez d'ailleurs aussi votre place à la page suivante...), Merci de m'avoir accompagnée tout au long de mon cursus dans mes débuts d'interne, de thésarde et d'assistante, et de m'avoir permis d'adapter la « part hospitalière » aux exigences de la « part universitaire ». Il m'aurait été impossible de mener à bien ce travail de thèse sans votre soutien et votre compréhension face aux exigences des manips, merci beaucoup !

A mon « parrain » Flo, à Claire,

Un merci spécial pour votre soutien et vos conseils. Merci de m'avoir fait profiter de votre expérience tant méthodologique et technique qu'administrative !

A Meryem Tardivel et Julia Salleron,

Un grand merci pour l'aide technique et statistique que vous m'avez apportée.

A mes parents,

Merci de votre soutien inconditionnel face à ce projet de deuxième thèse, de votre écoute et de votre disponibilité dans les moments de doute,

Merci de votre accueil « mieux qu'à l'hôtel » pour la partie bretonne de ce manuscrit,

Merci d'être toujours là, tout simplement.

....Et rassurez-vous, je sais bien qu'on dit « jamais 2 sans 3 », mais je pense que je vais en rester là !

A mes frères et sœur au top, PE, Victoire et Polo,

Il paraît qu'on choisit ses amis, mais pas sa famille. Ca tombe bien, je n'aurais pu mieux choisir ! Merci de votre soutien, de vos petites attentions, dans les moments de joie comme dans les moments difficiles. Vous savoir et vous avoir à mes côtés m'est très précieux.

A ma famille, oncles, tantes, cousins et cousines, et plus spécialement à mes grands-parents,

Vous aussi m'avez toujours soutenue, cela compte beaucoup pour moi et je vous en remercie.

Aux amis d'ici et d'ailleurs,

La bande de l'internat et ses pièces rapportées : Audrey, Cécile, Chloé, Clotilde, Delphine, Hélène, Jérémy, Max, Mélanie, Nico, Ozzy, Paul,

Les Nordistes, pure souche ou d'adoption : Anne-Laure, Antony, Baptiste, Béa, Caro, Céline, Clémence, Hadrien, Harold, Johana, Juliette, Marine, Valentine, Vivien,

Les Bretons : Alex, Aurélien, Caro, Dami, Jean-Louis, Jeff, Julien D, Julien M, Johanna, Lomig, Maëlle, Marlène,

Les Normands : Edmond, Etienne, Moumoutte, Perrine, Pilip, Sandrine, Sarah,

Les Parisiens : Amandine, Camille, Emeline, Hong-Hanh, Micka, Sylvie,

MERCI !

Pour vos encouragements et votre bonne humeur contagieuse dans les moments les plus difficiles (hé oui Sylvie... !),

Pour les soirées, week-ends, vacances passés ensemble à Rocques, Doëlan, Londres, Toulouse, Bordeaux, Paris et j'en oublie... en espérant qu'il y en ait encore beaucoup d'autres !

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
Données bibliographiques	6
I. Aspects physiopathologiques de l'ischémie cérébrale : une pathologie, de multiples acteurs, de multiples mécanismes	7
A. L'unité neurogliovasculaire.....	7
1. Les neurones.....	7
2. Les cellules gliales	8
3. Les vaisseaux sanguins cérébraux : caractéristiques et spécificités	10
B. Interactions au sein de l'UNGV	14
1. Neurotransmission.....	15
2. Régulation du débit sanguin cérébral	16
3. Barrière hémato-encéphalique.....	18
C. L'UNGV cible de l'ischémie cérébrale	20
1. Mécanismes physiopathologiques précoces.....	20
2. Mécanismes physiopathologiques « retardés »	22
3. Mort neuronale	25
4. Impact sur le compartiment vasculaire.....	26
5. Plasticité : neurogénèse et angiogénèse	28
II. Approches pharmacologiques classiques des accidents vasculaires cérébraux.....	28
A. Traitement préventif	28
B. Traitement à la phase aiguë	29
1. Prise en charge hospitalière	29
2. Restauration du flux sanguin : thrombolyse par l'altéplase	31
3. Possibilités d'optimisation thérapeutique.....	31
4. Autres agents fibrinolytiques	32
C. Approches de neuroprotection.....	33

1. Un cas d'école : le NXY-059	33
2. Les raisons de l'échec de cette approche	34
III. Une nouvelle approche pharmacologique dans l'ischémie cérébrale : l'approche pléiotrope.....	36
A. Stratégies utilisées en traitement préventif.....	37
1. Anti-agrégants plaquettaires.....	37
2. Anti-hypertenseurs	38
3. Hypolipémifiants	40
B. Stratégies à la phase aiguë	41
1. Minocycline.....	41
2. Facteurs de croissance	43
IV. Les statines : une stratégie pharmacologique intéressante ?	47
A. Propriétés pharmacologiques	47
1. Action princeps sur la synthèse du cholestérol	47
2. Mécanismes sous-tendant les effets pléiotropes des statines	47
B. Impact physiopathologique d'un traitement par statine dans l'ischémie cérébrale.....	50
C. Traitement préventif par statine.....	51
1. Données expérimentales.....	51
2. Données cliniques	52
D. Traitement par statine à la phase aiguë	53
1. Données expérimentales.....	53
2. Données cliniques	54
E. Bilan des études précliniques.....	54
Présentation du travail	61
Matériel et méthodes	63
I. Protocoles.....	64
A. Etude de l'effet neuro- et vasculoprotecteur aigu de l'atorvastatine.....	64

B. Etude de l'implication du récepteur PPAR α dans l'effet neuro- et vasculoprotecteur de l'atorvastatine	65
C. Critères d'inclusion et d'exclusion	66
1. Critères d'inclusion	66
2. Critères d'exclusion.....	67
II. Méthodes	67
A. Modèle d'ischémie cérébrale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne.....	67
B. Evaluation fonctionnelle.....	68
C. Euthanasie et préparation des tissus	70
1. Etude de la réactivité vasculaire	70
2. Etude histologique	70
3. Analyse génique et protéique	71
D. Réactivité vasculaire ex-vivo	71
1. Préparation de l'artère : prélèvement, canulation et stabilisation	71
2. Etude de la relaxation endothélium-dépendante	72
3. Relaxation endothélium-indépendante et implication du NO	73
E. Histomorphométrie	74
F. Analyse immunohistochimique des marqueurs vasculaires.....	75
1. Révélation colorimétrique	75
2. Immunofluorescence	75
3. Analyse semi-quantitative	76
G. Analyse de l'expression génique de la NOS endothéliale par rt-PCR	77
1. Purification et dosage des acides ribonucléiques	77
2. Synthèse des ADN complémentaires	78
3. PCR quantitative	78
H. Analyse de l'expression protéique d'ICAM-1 et VCAM par western-blot	79
1. Extraction et dosage des protéines	79

2. Migration et séparation.....	80
3. Immunodétection des protéines d'intérêt	80
I. Analyse statistique	81
Résultats	83
I. Effet neuroprotecteur de l'atorvastatine à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale	84
A. Suivi des animaux	84
1. Effectifs et mortalité.....	84
2. Evolution de la masse corporelle.....	86
B. Volume lésionnel.....	86
1. Impact à 24 heures de reperfusion.....	86
2. Impact à 72 heures de reperfusion.....	88
C. Récupération fonctionnelle.....	89
1. Score neurologique.....	89
2. Grip test	90
3. Test de la barre	91
4. Test du retrait de l'adhésif.....	91
5. Résultats des tests pour les animaux sham.....	94
II. Effets vasculaires de l'atorvastatine à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale.....	94
A. Impact sur la dysfonction endothéliale post-ischémique	94
1. Etude de la relaxation endothélium-dépendante	95
2. Etude de la relaxation endothélium-indépendante	98
3. Part jouée par la production endothéliale de NO	98
B. Impact sur les microvaisseaux.....	99
C. Impact sur les interactions entre leucocytes et endothélium	101
1. Adhésion leucocytaire : marquage de la protéine d'adhésion ICAM-1	101
2. Infiltration des polynucléaires neutrophiles : marquage de la myéloperoxydase ..	103

III. Implication du récepteur nucléaire PPAR α dans l'effet neuroprotecteur de l'atorvastatine	104
A. Volume lésionnel.....	104
1. Traitement préventif.....	104
2. Traitement aigu	105
B. Impact vasculaire (en traitement préventif).....	105
1. Expression des protéines d'adhésion.....	105
2. Expression de la NOS endothéliale	106
Article n°1	107
Article n°2	119
Discussion	149
I. Traitement par atorvastatine à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale : des effets bénéfiques pléiotropes.....	151
A. Caractérisation des effets pléiotropes au niveau cellulaire : neuroprotection et récupération fonctionnelle.....	151
B. Caractérisation des effets pléiotropes au niveau cellulaire : impact sur le compartiment vasculaire.....	153
C. Caractérisation des effets pléiotropes au niveau moléculaire : implication du récepteur nucléaire PPAR α	157
D. Aspects restant à évaluer dans la caractérisation de l'effet pléiotrope des statines : impact sur les cellules gliales et glioprotection.....	159
II. Statines dans l'ischémie cérébrale : de l'animal à l'Homme.....	159
A. Bilan de l'évaluation préclinique des statines	159
B. Bilan de l'évaluation clinique des statines.....	165
III. Les statines : vers le concept de disease-modifier ?.....	168
Références	172
Annexe	199

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Artères assurant l'irrigation cérébrale.....	11
Figure 2 : Polygone de Willis et artères cérébrales.....	12
Figure 3 : Vascularisation cérébrale – anatomie et innervation..	14
Figure 4: Interactions au sein de l'unité neuroglivovasculaire.....	15
Figure 5 : Régulation de l'activité de la NOS endothéliale.....	18
Figure 6 : Anatomie de la BHE.....	19
Figure 7 : Physiopathologie de l'ischémie cérébrale.....	21
Figure 8 : Adhésion et infiltration leucocytaire.	24
Figure 9 : Perte des interactions et mort cellulaire	26
Figure 10 : Ouverture biphasique de la BHE.	27
Figure 11: Les différentes statines..	48
Figure 12 : Voie du mévalonate et effets pléiotropes des statines.	49
Figure 13 : Traitement aigu par atorvastatine – protocole court.	64
Figure 14 : Traitement aigu par atorvastatine – protocole long.	64
Figure 15 : Protocole d'étude de l'implication du récepteur PPAR α – traitement préventif par atorvastatine.	66
Figure 16 : Protocole d'étude de l'implication du récepteur PPAR α – traitement post-ischémique par atorvastatine.	66
Figure 17 : Modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale par occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne.....	68
Figure 18 : Souris saine soumise au grip test.	69
Figure 19 : Souris saine soumise au test de la barre.....	69
Figure 20 : Souris saine soumise au test du retrait de l'adhésif.	70
Figure 21 : Principe de fonctionnement d'un artériographe d'Halpern.	72
Figure 22 : Protocole de réactivité vasculaire – exemple de tracé obtenu pour un animal du groupe IR+AT20 à 72 heures de reperfusion..	74
Figure 23 : Exemple de coloration au crésyl violet – animal du groupe IR+Veh à 24 heures de reperfusion.....	75
Figure 24: Zones de quantification des marquages immunohistochimiques.	77
Figure 25 : Répartition des effectifs et issue à 24 heures de reperfusion.....	84
Figure 26 : Répartition des effectifs et issue à 72 heures de reperfusion.....	85
Figure 27 : Volumes lésionnels à 24 heures de reperfusion.....	87

Figure 28 : Volumes lésionnels à 72 heures de reperfusion.....	89
Figure 29 : Evolution des scores neurologiques moyens.	90
Figure 30 : Résultats du grip test - Evolution de la force de traction moyenne	90
Figure 31 : Résultats du test de la barre - Evolution du temps de maintien moyen.	91
Figure 32 : Résultats du test du retrait de l'adhésif - Evolution du délai de détection.	92
Figure 33 : Résultats du test du retrait de l'adhésif - Evolution du délai de retrait pour la patte gauche.....	93
Figure 34 : Résultats du test du retrait de l'adhésif - Evolution du délai de retrait pour la patte droite.....	93
Figure 35: Courbes concentration-réponse à la carbamoylcholine : effet d'un traitement de 72 heures par atorvastatine.	95
Figure 36 : Courbes concentration-réponse : sensibilité à la carbamoylcholine et estimation des CE50 à 72 heures de reperfusion.	97
Figure 37 : Exemples de marquages pour le collagène de type IV dans la zone lésée.	99
Figure 38 : Fraction d'aire occupée par le marquage du collagène de type IV à 24 et 72 heures de reperfusion dans la zone lésée.	100
Figure 39 : Intensité moyenne de fluorescence pour le marquage du collagène de type IV à 24 et 72 heures de reperfusion dans la zone lésée.....	101
Figure 40 : Exemples de marquages pour ICAM-1 dans la zone lésée.....	102
Figure 41 : Nombre moyen de vaisseaux immunomarqués pour ICAM-1 dans la zone lésée à 24 et 72 heures de reperfusion.....	102
Figure 42 : Exemples de marquages pour la myéloperoxydase à 24 et 72 heures de reperfusion	103
Figure 43 : Nombre moyen de cellules immunomarquées pour la myéloperoxydase et infiltrées dans la zone lésée à 24 et 72 heures de reperfusion.....	104
Figure 44 : Effet d'un traitement aigu par atorvastatine sur le volume lésionnel cérébral – Résultats pour les souris sauvages et les souris KO-PPAR α à 72 heures de reperfusion.	105

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales caractéristiques des artères cérébrales.	13
Tableau 2 : Recommandations du comité STAIR.	35
Tableau 3 : Traitement préventif par statine et neuroprotection dans l'ischémie cérébrale expérimentale – données précliniques.	54
Tableau 4 : Traitement aigu par statine et neuroprotection dans l'ischémie cérébrale expérimentale – données précliniques.	58
Tableau 5 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunohistochimie.	76
Tableau 6 : Séquence des amorces utilisées pour l'analyse génique.	79
Tableau 7 : Anticorps utilisés pour l'analyse protéique.	81
Tableau 8 : Répartition des animaux pour les différentes manipulations à 24 heures de reperfusion.	85
Tableau 9 : Répartition des animaux pour les différentes manipulations à 72 heures de reperfusion.	86
Tableau 10 : Evolution des masses corporelles après ischémie-reperfusion.	86
Tableau 11 : Volumes lésionnels moyens évalués à 24 heures de reperfusion.	87
Tableau 12 : Volumes lésionnels moyens évalués à 72 heures de reperfusion.	88
Tableau 13 : Résultats des tests fonctionnels pour les animaux sham.	94
Tableau 14 : Diamètres moyens et réponse maximale de l'ACM isolée à la carbamoylcholine chez les animaux sains et opérés non ischémiés.	96
Tableau 15 : Diamètres moyens et réponse maximale de l'ACM isolée à la carbamoylcholine chez les animaux soumis à ischémie-reperfusion cérébrale.	96
Tableau 16 : Valeurs moyennes des CE50.	98
Tableau 17 : Réponse au SNP chez les animaux sham.	98
Tableau 18 : Réponse au SNP chez les animaux ischémiés.	98
Tableau 19 : Part de la relaxation maximale à la CCh imputable à la production endothéliale de NO.	99
Tableau 20: Principaux résultats des méta-analyses de l'effet neuroprotecteur des statines dans l'ischémie cérébrale expérimentale.	160
Tableau 21 : Statines et thrombolyse – données précliniques.	163
Tableau 22 : Statines et traitement à long terme – données précliniques.	165

ABREVIATIONS

4S	Scandinavian Simvastatin Survival Study	EuroHYP-1	Cooling Plus Best Medical Treatment Versus Best Medical Treatment Alone for Acute Ischaemic Stroke
Aβ	Peptide bêta-amyloïde	FAM	Formaldéhyde – Acétone – Méthanol
ACM	Artère Cérébrale Moyenne	G-CSF	Facteur de croissance granulocytaire
ADMA	Diméthyl arginine asymétrique	GDNF	Glial cell Derived Neurotrophic Factor
AGE	Produits de glycation avancée	GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
AIC	Accident Ischémique Constitué	HMG-CoA	HydroxyMéthylGlutaryl Co-enzyme A
AIT	Accident Ischémique Transitoire	HEL	Hexanonyl-Lysine
ANOVA	Analyse de Variance	HNE	Hydroxy-Nonénal
ATTEST	Alteplase-Tenecteplase Trial Evaluation for Stroke Thrombolysis	HOPE	Heart Outcomes Prevention Evaluation
AVC	Accident Vasculaire Cérébral	ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1
AXIS-2	AX200 for the Treatment of Ischemic Stroke	IEC	Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor	IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
BH4	Tétrahydrobioptérine	IST-3	International Stroke Trial-3
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique	JAM	Molécule d'Adhésion Jonctionnelle
CAMARADES	Collaborative Approach to Meta Analysis and Review of Animal Data from Experimental Stroke	KPBS	Potassium Phosphate Buffer Saline
DAMP	Danger-Associated Molecular Pattern	LOX	Lipo-oxygénase
DIAS-3	Efficacy and Safety Study of Desmoteplase to Treat Acute Ischemic Stroke-3	L-NNA	N _ω -Nitro-L-Arginine
DIAS-4	Efficacy and Safety Study of Desmoteplase to Treat Acute Ischemic Stroke-4	MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
DIAS-J	Clinical Study of Desmoteplase in Japanese Patients With Acute Ischemic Stroke	MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein-1α
ECASS-III	European Cooperative Acute Stroke Study-III	MIP	Maximum Intensity Projection
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor	MMP	Métalloprotéase Matricielle
EGR1	Récepteur du facteur de croissance épidermique-1	MPO	Myéloperoxydase
EPO	Erythropoïétine	MRP	Multidrug Resistance-associated Protein
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase	NeuMAST	Neuroprotection With Minocycline Therapy for Acute Stroke Recovery Trial
ESS	Multicenter Efficacy Study of Recombinant Human Erythropoietin in Acute Ischemic Stroke	NeuSTARTII	Neuroprotection with Statin Therapy for Acute Recovery Trial
EUREKA	Effects of Very Early Use of Rosuvastatin in Preventing Recurrence of Ischemic Stroke	NGF	Nerve Growth Factor
		NOS	NO Synthase
		8-OHdG	8-Hydroxy déoxy-Guanosine
		PAI-1	Inhibiteur de l'Activateur tissulaire du Plasminogène-1
		PAR 1	Proteinase-Activated Receptor-1
		PARP-1	Poly-ADP-Ribose Polymérase-1
		PBS	Phosphate Buffer Saline
		PDGFβ	Platelet Derived Growth Factor β
		PLA2	PhosphoLipase A2

pMCAO	Occlusion permanente de l'Artère Cérébrale Moyenne	STAIR	Stroke Therapy Academic Industry Roundtable
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor	STARS07	Stroke Treatment With Acute Reperfusion and Simvastatin
PPRE	PPAR Response Elements	TBP	TATA-Box Binding Protein
PROGRESS	Perindopril Protection Against Recurrent Stroke Study	tCCAO	Occlusion transitoire des Artères Carotides Communes
PROSPER	Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk	TEMPO-1	TNK-tPA Evaluation for Minor Ischemic Stroke With Proven Occlusion
PS1	Préséniline-1	TF	Facteur tissulaire
RAGE	Récepteur pour les produits de glycation avancée	TGFβ	Transforming Growth Factor β
rtPA	Activateur tissulaire recombinant du plasminogène	TLR	Récepteur Toll-Like
RVB	Rouge Vert Bleu	tMCAO	Occlusion transitoire de l'Artère Cérébrale Moyenne
RXR	Récepteur X des Rétinoïdes	TNFα	Tumor Necrosis Factor α
SAINT-I	Stroke Acute Ischemic NXY Treatment I	tPA	Activateur tissulaire du plasminogène
SAINT-II	Stroke Acute Ischemic NXY Treatment II	TST	Treat Stroke to Target
SHR	Rats Spontanément Hypertendus	UNGV	Unité Neuro-Glio-Vasculaire
SHR-SP	Rats Spontanément Hypertendus – Stroke Prone	UNV	Unité Neuro-Vasculaire (service hospitalier)
SNP	Nitroprussiate de Sodium	VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
SPARCL	Stroke Prevention by Aggressive Cholesterol Lowering	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
		vWF	Facteur von Willebrand

INTRODUCTION

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Il représente actuellement la quatrième cause de mortalité et la première cause de handicap d'origine non traumatique chez l'adulte (Go et al., 2013). Il est également la deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer. En France les AVC étaient responsables en 2008 de 6,1% des décès (DREES, 2012). L'incidence est restée stable ces dernières années, avec environ 130 000 nouveaux cas par an, conséquence d'un équilibre entre le vieillissement de la population et l'amélioration de la prévention primaire (Bejot et al., 2009a). Cette incidence augmente toutefois avec l'âge et double tous les 10 ans après 55 ans (Ferry-Lemonnier et Comité de pilotage sur la prévention et la prise en charge des AVC, 2009). Malgré les progrès manifestes de ces dernières années, notamment grâce à la mise en place de filières de prise en charge et d'unités hospitalières dédiées, cette pathologie conserve un poids particulier, socioéconomique bien sûr, mais surtout humain avec, pour le patient et son entourage, une qualité de vie bien souvent dégradée (Donnan et al., 2008).

Les AVC d'origine ischémique sont les plus fréquents, puisqu'ils concernent plus de 80% des patients, la part restante étant représentée par les AVC d'origine hémorragique (EROS Investigators, 2009). L'AVC ischémique se caractérise par une occlusion vasculaire cérébrale, le plus fréquemment d'origine athérosclérotique ou liée à la migration d'un embolie d'origine cardiaque (Benatru et al., 2006). Il se traduit par l'apparition brutale d'un déficit neurologique correspondant au territoire cérébral atteint. Cette interruption du flux sanguin cérébral peut être transitoire ou prolongée : dans le premier cas, la circulation sanguine est rapidement rétablie, ce qui permet la régression des symptômes en moins de 24 heures ; dans le deuxième cas, l'accident ischémique se caractérise par une persistance de la symptomatologie au-delà de 24 heures, liée à la constitution de lésions cérébrales définitives.

Bien que défini par un évènement aigu, l'occlusion vasculaire, l'AVC s'apparente également à une pathologie chronique. En effet, cet évènement aigu résulte de la conjonction de facteurs de risque vasculaire, préexistant et évoluant depuis plusieurs années. Par ailleurs, ses suites peuvent être marquées par des séquelles notamment fonctionnelles, cognitives, et comportementales, impactant significativement la qualité de vie des patients. Ces particularités expliquent les difficultés de prise en charge thérapeutique de cette pathologie, qui ne saurait se limiter à la seule phase aiguë.

Actuellement, la prise en charge thérapeutique de l'AVC ischémique repose sur trois stratégies : la prévention, la prise en charge adaptée à la phase aiguë dans une filière

hospitalière dédiée et l'administration éventuelle du seul traitement spécifique disponible, le traitement thrombolytique.

La prise en charge des facteurs de risque vasculaire, aujourd'hui bien identifiés, est majeure et on dispose d'un arsenal thérapeutique, notamment pharmacologique, bien pourvu sur lequel nous reviendrons plus en détail dans ce manuscrit. La mise en place de ces mesures de prévention est à l'origine d'une diminution de l'incidence et de la sévérité des AVC ischémiques (Deplanque et al., 2006; Donnan et al., 2008).

La mise en place de filières spécialisées, au sein desquelles les Unités Neuro-Vasculaires (UNV), unités hospitalières dédiées disposant d'équipes pluridisciplinaires, tiennent une place centrale, a permis d'améliorer significativement la prise en charge des patients. Le tri, l'orientation et la prise en charge rapide et efficace des patients permettent l'établissement d'un diagnostic et la mise en place de thérapeutiques adaptées dans un délai réduit. Cette prise en charge impacte directement le pronostic en termes de diminution des séquelles et de la mortalité : l'hospitalisation en UNV permet ainsi d'éviter un décès pour 33 patients pris en charge, et une institutionnalisation pour 20 patients traités (Stroke Unit Trialists' Collaboration, 2007), et ce indépendamment du sexe, de l'âge, du type d'AVC et des comorbidités associées. De plus, ces filières présentent un intérêt médico-économique non négligeable, avec diminution de la durée moyenne de séjour pour AIT et AVC ischémique, et donc une diminution des coûts liés à ces hospitalisations (Yekhlief et al., 2010; Zhu et al., 2009).

La diminution des délais de prise en charge liée à l'organisation et à la spécialisation de la structure permet également un accès plus rapide aux traitements (Strbian et al., 2013). Le seul traitement pharmacologique spécifique de la phase aiguë de l'ischémie cérébrale et disponible à l'heure actuelle est le traitement thrombolytique par analogue recombinant de l'activateur tissulaire du plasminogène, ou rtPA (altéplase – ACTILYSE®). Son utilisation est soumise à de nombreuses contraintes. Elle est limitée à une fenêtre temporelle étroite, 4h30 après le début des symptômes, au-delà de laquelle le rapport bénéfice/risque devient clairement défavorable en raison d'une majoration du risque de transformation hémorragique secondaire (Hacke et al., 2008). La mise en place des UNV a permis d'augmenter la proportion de patients éligibles à ce traitement (Pérez de la Ossa et al., 2009; Prabhakaran et al., 2013). L'augmentation du nombre de thrombolyse dans les hôpitaux dotés d'une UNV en témoigne. Au Canada, l'ouverture en 2001 d'une UNV au centre hospitalier Foothills de

Calgary a permis à 12% des patients souffrant d'un AVC ischémique de bénéficier d'un traitement thrombolytique, contre 5% l'année précédente (Zhu et al., 2009).

Concernant les conséquences à long terme, il n'existe à l'heure actuelle pas de stratégie pharmacologique efficace pour réduire la charge lésionnelle et le déficit fonctionnel qui lui est associé. La prise en charge clinique consiste en une rééducation adaptée aux déficits que présente le patient : rééducation physique par un kinésithérapeute, prise en charge des troubles du langage par un orthophoniste, réapprentissage des gestes du quotidien et adaptation de l'environnement du patient par un ergothérapeute par exemple...

A l'échelon cellulaire, la mise en place de modèles animaux a permis une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques intervenant à la phase aiguë de l'ischémie-reperfusion cérébrale, en termes de cinétique et d'impact lésionnel. La modélisation et les progrès des techniques d'imagerie ont également permis de mettre en évidence une évolution biphasique de la lésion ischémique et de faire émerger les notions de cœur de l'ischémie et de zone de pénombre (Dirnagl et al., 1999). Le cœur est la zone où la réduction du débit sanguin est la plus sévère, et où la perte cellulaire est la plus rapide et la plus importante. Il est entouré par une zone de pénombre, où la réduction des apports sanguins est moindre et où les capacités métaboliques sont en partie préservées. Cette zone métastable évolue vers l'infarctus constitué en l'absence de restauration rapide, physiologique ou pharmacologique, du flux sanguin. Les efforts se sont donc concentrés sur les cellules en souffrance de la zone de pénombre, la survie prolongée de ces cellules les rendant accessibles à l'intervention thérapeutique. Toutefois, la seule stratégie disponible actuellement repose sur la restauration du flux sanguin et aucune stratégie à visée protectrice cellulaire n'a pour le moment fait preuve d'une efficacité clinique significative.

La nécessité de nouvelles stratégies pour une prise en charge optimale de l'infarctus cérébral apparaît donc clairement. Cette prise en charge thérapeutique devra permettre de diminuer les conséquences motrices, cognitives et comportementales de l'ischémie et pourrait être définie selon trois axes :

- 1) La maîtrise des facteurs de risque vasculaire afin de limiter le risque de survenue d'un AVC, ou tout au moins d'en limiter la sévérité (mesures de protection préventive) ;

- 2) A la phase aiguë, la disponibilité de thérapeutiques permettant de limiter l'extension lésionnelle en ciblant les cellules de la zone de pénombre (mesures de protection aiguës) ;
- 3) A long terme, la mise en place de traitements qui permettraient de renforcer les mécanismes protecteurs ou réparateurs endogènes et/ou induire la mise en place de mécanismes protecteurs afin de limiter les conséquences à long terme de la lésion ischémique (mesures de protection à long terme).

Elle devra, pour répondre à ces objectifs, reposer sur des thérapeutiques à spectre d'action large, et intervenir non seulement sur les mécanismes impliqués mais également sur les différents compartiments de l'unité neurogliovasculaire, qui est l'entité complexe en réalité concernée dans l'AVC (Zhang et al., 2012).

Mon travail de thèse s'inscrit dans cette dynamique et s'est intéressé particulièrement à l'étude d'une statine comme nouvelle thérapeutique en utilisation préventive et à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale. Avant de présenter les résultats obtenus, la physiopathologie de l'ischémie cérébrale sera détaillée, puis sera réalisée une revue de la littérature concernant (i) les stratégies pharmacologiques classiques dans la prise en charge des accidents vasculaires cérébraux ; (ii) l'intérêt de développer des approches thérapeutiques à spectre plus large, illustré de quelques exemples ; et (iii) la place des statines dans ce contexte.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Aspects physiopathologiques de l'ischémie cérébrale : une pathologie, de multiples acteurs, de multiples mécanismes

A. L'unité neurogliovasculaire

Comme son nom l'indique, l'unité neurogliovasculaire (UNGV) regroupe trois compartiments cellulaires bien distincts : les neurones, les cellules gliales (microglie, astrocytes et péricytes) et les vaisseaux sanguins.

1. Les neurones

Les neurones sont les cellules effectrices du système nerveux central, à la fois excitables et excitatrices, impliquées dans le traitement du signal, son intégration et, en réponse, dans l'émission d'un message nerveux. Ces cellules sont très différenciées au plan anatomique et s'organisent en réseaux complexes. Deux types de prolongements cellulaires les caractérisent : l'axone, long prolongement unique pouvant être entouré d'une gaine de myéline et assurant la transmission du message nerveux aux neurones voisins, et les dendrites, petits prolongements courts et extrêmement ramifiés permettant la réception de ce message au niveau des épines dendritiques. La synapse représente l'interface de transmission du message nerveux, entre le neurone pré-synaptique émetteur et le neurone post-synaptique récepteur.

Les neurones possèdent la capacité à intégrer un message nerveux de nature électrique, le potentiel d'action lié à des échanges ioniques (sodium, potassium) de part et d'autre de la membrane cellulaire perturbant le potentiel de repos de cette membrane, pour le convertir en un message chimique par libération de neurotransmetteurs au niveau synaptique. Le potentiel d'action chemine le long de l'axone jusqu'à atteindre une des extrémités terminales de l'axone, ou bouton synaptique. Son arrivée entraîne la migration et la fusion des vésicules de transport des neurotransmetteurs à la membrane synaptique. Ces vésicules sont notamment constituées de synaptophysine, protéine utilisée comme marqueur histologique des synapses fonctionnelles. Les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique vont se fixer sur leurs récepteurs situés sur la membrane post-synaptique. Les flux ioniques résultant de l'activation de ces récepteurs vont générer finalement un nouveau potentiel d'action, progressant à la membrane du neurone post-synaptique jusqu'à atteindre l'axone. Les neurotransmetteurs seront ensuite dégradés *in situ* ou recaptés.

La transmission du message nerveux représente une dépense énergétique majeure. Les neurones nécessitent donc un approvisionnement sanguin continu en nutriments, glucose et oxygène. Ces besoins métaboliques très importants et les stocks énergétiques restreints rendent le neurone particulièrement sensible à l'interruption du flux sanguin.

2. Les cellules gliales

i. Les astrocytes

Ces cellules se caractérisent par une forme étoilée, chaque astrocyte émettant en moyenne 5 à 8 processus, eux-mêmes finement ramifiés. Le tissu astrocytaire est très organisé et forme en fait une mosaïque tridimensionnelle, chaque cellule définissant par ses ramifications un domaine anatomique qui lui est propre. Les astrocytes ne sont pas excitables électriquement, à la différence des neurones, mais vont répondre aux stimuli extérieurs par des variations de la concentration intracellulaire en calcium, sous forme d'oscillations isolées ou de vagues se propageant aux astrocytes voisins (Sofroniew et Vinters, 2010).

Les astrocytes sont le type cellulaire majoritaire dans le système nerveux central et on a longtemps pensé qu'ils n'assuraient qu'un rôle assez secondaire. Il est maintenant bien établi qu'ils établissent des interactions complexes et indispensables au plan physiologique avec les compartiments neuronal et vasculaire, intervenant ainsi dans la constitution de la barrière hémato-encéphalique et le maintien de l'homéostasie tissulaire par captation et stockage du glucose à partir de la circulation sanguine. Les astrocytes possèdent la capacité de s'activer face à une agression. Ce phénomène d'astrogliose se caractérise, au plan histologique, par une surexpression de la protéine fibrillaire GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) et par une prolifération cellulaire pouvant conduire à la formation d'une cicatrice gliale (Sofroniew et Vinters, 2010).

ii. La microglie

Les cellules microgliales sont considérées comme les cellules immunocompétentes du système nerveux central. Elles présentent en effet des caractéristiques communes avec les monocytes/macrophages et interviennent dans le remodelage tissulaire et la réponse immunitaire innée, par leurs capacités de détection, d'activation, de phagocytose et de présentation d'antigène. Les cellules possèdent une morphologie bien particulière. Le corps cellulaire est de petite taille et associé à de nombreuses ramifications. La microglie joue un

rôle de sentinelle, et est dite quiescente à l'état basal. Grâce à leurs ramifications mobiles, les cellules microgliales surveillent leur environnement en continu et sont capables, en cas d'agression, de se déplacer rapidement au site de lésion, sans perturber le réseau neuronal environnant, et de s'activer pour répondre à toute perturbation de l'homéostasie (Hanisch et Kettenmann, 2007).

L'acquisition du phénotype activé survient (i) en cas de baisse d'intensité des stimuli inhibiteurs comme la fractalkine CX3CL1 libérée par les neurones en situation de stress, pour laquelle les cellules microgliales expriment le récepteur membranaire correspondant CX3CR1, mais également (ii) au contact de stimuli extérieurs inhabituels, pouvant être de nature très diverse : cytokines, glutamate, constituants intracellulaires (protéines, acides nucléiques...). L'activation résulte en des modifications morphologiques, la cellule microgliale acquiert alors une forme amiboïde et les ramifications cellulaires raccourcissent, ainsi qu'en des modifications fonctionnelles sur lesquelles nous reviendrons lors de la description de la cascade physiopathologique.

iii. Péricytes

Les péricytes sont situés au niveau des capillaires, artérioles et veinules cérébraux. Ils s'insèrent dans la lame basale des vaisseaux sanguins (Fisher, 2009) et ce sont les seules cellules au contact des cellules endothéliales des capillaires cérébraux dépourvus de tunique musculaire (Dalkara et al., 2011). Ils interagissent principalement par l'intermédiaire du Platelet-Derived Growth Factor β (PDGF β) libéré par les cellules endothéliales et pour lequel les péricytes expriment le récepteur membranaire correspondant. Bien qu'encore difficilement identifiables au plan histologique, (on ne dispose en effet pas de marqueur spécifique de ce type cellulaire), les péricytes sont par contre aujourd'hui bien identifiés au plan fonctionnel (Dalkara et al., 2011; Fisher, 2009) :

- Capacité de contraction en réponse aux agents vasoactifs : le cytosquelette est riche en protéines contractiles (α -actine, tropomyosine...) ;
- Rôle dans l'angiogénèse : les péricytes aident à la structuration et à la définition du calibre des vaisseaux nouvellement formés, et libèrent des facteurs de croissance (angiopoïétines 1 et 2) ;

- Constitution et maintien de la barrière hémato-encéphalique : les péricytes sont situés préférentiellement au niveau des jonctions serrées et ont la capacité de synthétiser les constituants de la membrane basale ;
- Immunité et phagocytose : les péricytes possèdent les capacités d'expression de molécules d'adhésion membranaires et de présentation d'antigène.

3. Les vaisseaux sanguins cérébraux : caractéristiques et spécificités

i. Caractéristiques anatomiques (Cipolla, 2009)

L'apport sanguin cérébral est assuré par les artères vertébrales droite et gauche, qui assurent principalement la vascularisation du tronc cérébral et du cervelet, et les artères carotides internes droite et gauche responsables de la majorité de l'apport sanguin au cerveau. Ces quatre artères s'anastomosent pour former à la base du cerveau le polygone de Willis, d'où naissent trois paires d'artères cérébrales antérieures, moyennes et postérieures. Ces artères cérébrales courent à la surface du cerveau où elles se ramifient en artères de plus petit calibre puis en artérioles pour pénétrer finalement le parenchyme cérébral.

a) Système carotidien (figure 1)

Les deux artères carotides communes, issues de l'aorte, cheminent dans la région cervicale, où elles se divisent en deux branches que sont la carotide interne et la carotide externe, cette dernière assurant la vascularisation de la face et du cou.

La carotide interne suit un trajet vertical ascendant, et est à l'origine de diverses collatérales : l'artère ophtalmique, l'artère communicante postérieure qui rejoint en arrière l'artère cérébrale postérieure faisant partie du système vertébral, et l'artère choroïdienne antérieure. Elle chemine ensuite jusqu'à atteindre la surface du cerveau, à proximité du chiasma optique. A ce niveau, elle se divise en deux branches terminales qui sont l'artère cérébrale antérieure et l'artère cérébrale moyenne (ACM) ou artère sylvienne. L'artère cérébrale antérieure s'engage dans la scissure inter-hémisphérique, et se ramifie à la face médiane des lobes frontal et pariétal en contournant le corps calleux. Elle irrigue le cortex moteur et sensitif qui correspond au membre inférieur. L'artère cérébrale moyenne, ou artère sylvienne, entre dans la scissure de Sylvius et se ramifie en plusieurs branches irriguant la surface latérale des lobes frontal, pariétal et temporal. Le territoire vasculaire de l'artère

cérébrale moyenne concerne les cortex moteur et sensitif correspondant à la totalité du corps, à l'exception des membres inférieurs.

b) Système vertébral (figure 1)

Les artères vertébrales droite et gauche sont issues des artères sous-clavières, et cheminent le long des vertèbres cervicales, généralement à partir de la septième ou de la sixième vertèbre cervicale, dans un canal osseux situé dans l'apophyse latérale des corps vertébraux. Après avoir traversé la dure-mère, elles se réunissent pour former le tronc basilaire. Ce tronc va ensuite se diviser en plusieurs branches : les artères spinales, les artères cérébelleuses ainsi que les artères cérébrales postérieures irriguant le cortex visuel et la face interne du lobe temporal. Des artères cérébrales postérieures vont naître les artères choroïdiennes postérieure et moyenne, qui, avec l'artère choroïdienne antérieure issue de la carotide interne, vont former les plexus choroïdes, assurant la sécrétion du liquide céphalorachidien.

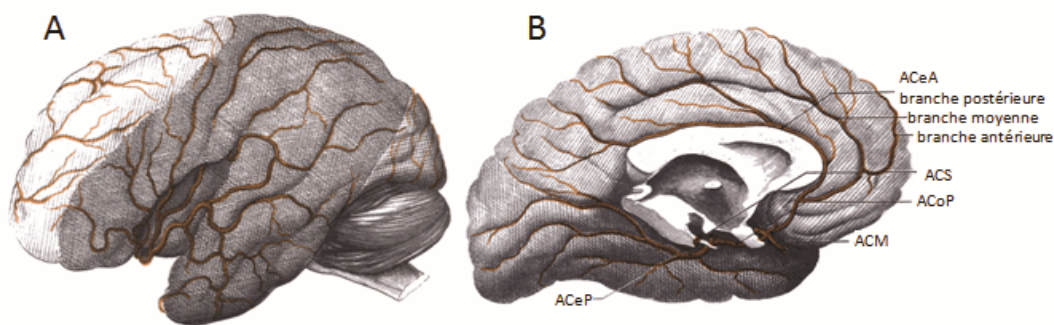


Figure 1 : Artères assurant l'irrigation cérébrale. A : face externe. B : face interne.

Le territoire de l'artère cérébrale antérieure est figuré en traits obliques, celui de l'artère cérébrale moyenne en quadrillé serré. ACeA = artère cérébrale antérieure ; ACS = artère cérébelleuse supérieure ; ACoP = artère communicante postérieure ; ACM = artère cérébrale moyenne ; ACeP = artère cérébrale postérieure. D'après Rouviere et al., 2002.

c) Anastomoses et suppléances

Des anastomoses existent entre les systèmes décrits précédemment. Elles vont assurer une vascularisation de suppléance et participer au maintien du flux sanguin en cas d'obstruction de l'une des artères concernées. Le principal niveau d'anastomose est le polygone de Willis (figure 2), correspondant à la réunion du système carotidien et du système vertébral, et formant un cercle artériel situé à la base du cerveau. Il englobe :

- les artères carotides internes et les artères cérébrales antérieures, reliées par l'artère communicante antérieure ;
- l'extrémité du tronc basilaire et les artères cérébrales postérieures, reliées aux carotides internes par l'artère communicante postérieure.

Sa morphologie est variable, on considère qu'il n'est complet que chez environ 50% des individus. Les anomalies rencontrées sont notamment l'hypoplasie d'une ou des deux artères communicantes antérieures ou postérieures. Par contre, les branches profondes des artères cérébrales ne s'anastomosent pas. Elles sont dites terminales, et il n'existe donc pas de suppléance possible en cas d'obstruction à ce niveau.

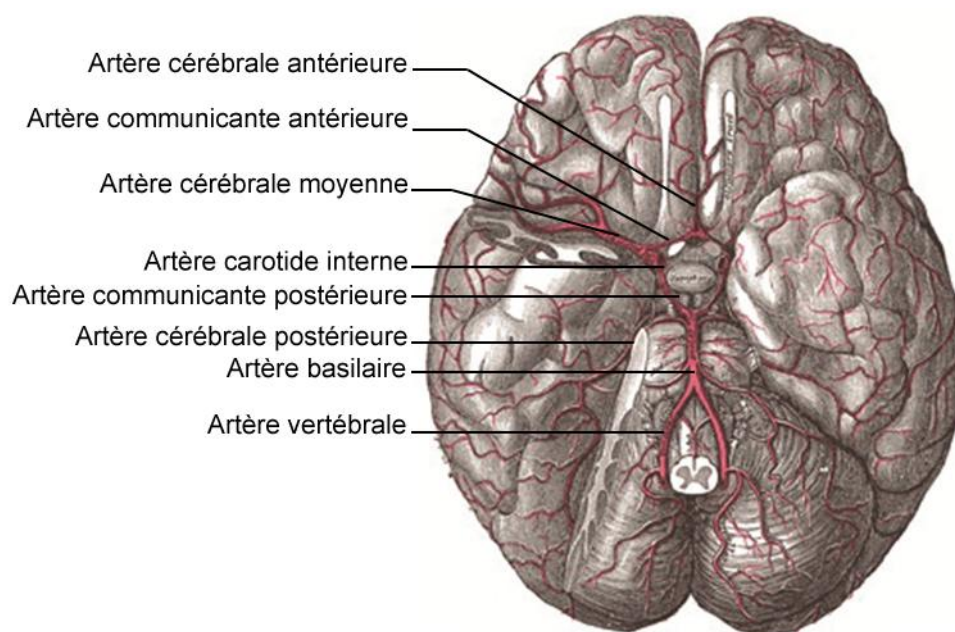


Figure 2 : Polygone de Willis et artères cérébrales. D'après Rouviere et al., 2002.

ii. Caractéristiques structurales

a) Artères cérébrales

Comme les artères irriguant le reste de l'organisme, les artères cérébrales sont constituées de trois feuillets : intima, media et adventice (figure 3), mais présentent des caractéristiques structurales qui leur sont propres. L'intima est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une limitante élastique interne plus développée qu'en périphérie. La media est constituée d'une ou plusieurs couches de cellules musculaires lisses et est relativement pauvre en fibres élastiques. Enfin, l'adventice, fine au niveau cérébral, est constituée de fibres collagéniques, de fibroblastes. Cette tunique externe constitue une

interface pour les interactions entre le vaisseau sanguin et les cellules adjacentes, astrocytes et péricytes, dont les caractéristiques ont été détaillées précédemment.

On distingue classiquement les artères de surface, ou artères piales, qui courent dans la pie-mère, des artères perforantes qui pénètrent le parenchyme cérébral. Les principales différences sont données dans le tableau 1.

Tableau 1 : Principales caractéristiques des artères cérébrales.

	Artères piales	Artères perforantes
Calibre	Constant	Se réduit au fur et à mesure de leur pénétration dans le parenchyme pour donner les artérioles parenchymales
Structure de la media	Plusieurs couches de cellules musculaires lisses	Couche unique de cellules musculaires lisses
Innervation	Extrinsèque (système nerveux périphérique)	Intrinsèque (neuropile)
Réseau de suppléance	Oui	Non
Interactions avec autres constituants de l'UNGV	Non	Astrocytes, péricytes

b) Microcirculation

La microcirculation cérébrale est assurée par un vaste réseau ramifié de capillaires sanguins, irrigué par les artérioles parenchymales. La longueur totale du réseau capillaire dans le cerveau humain est estimée à 644 kilomètres environ, il existerait en effet presque un capillaire par neurone (Cipolla, 2009). La structure des capillaires est moins complexe que celle des artères. Une couche unique de cellules endothéliales repose sur une lame basale riche en collagène de type IV, protéoglycanes à héparane sulfate, laminine et fibronectine.

Le capillaire est le site d'échange des nutriments et de l'oxygène entre le sang circulant et les cellules du parenchyme cérébral. La densité du réseau varie selon la zone considérée et est notamment conditionnée par les besoins métaboliques du tissu environnant. Elle peut également être influencée par différents facteurs physiologiques et pathologiques. C'est à ce niveau, plus qu'au niveau des artères de gros calibre, qu'auront lieu les interactions avec les autres constituants de l'unité neuroglivasculaire, impliquées dans la constitution de la barrière hémato-encéphalique et dans la régulation du débit sanguin cérébral.

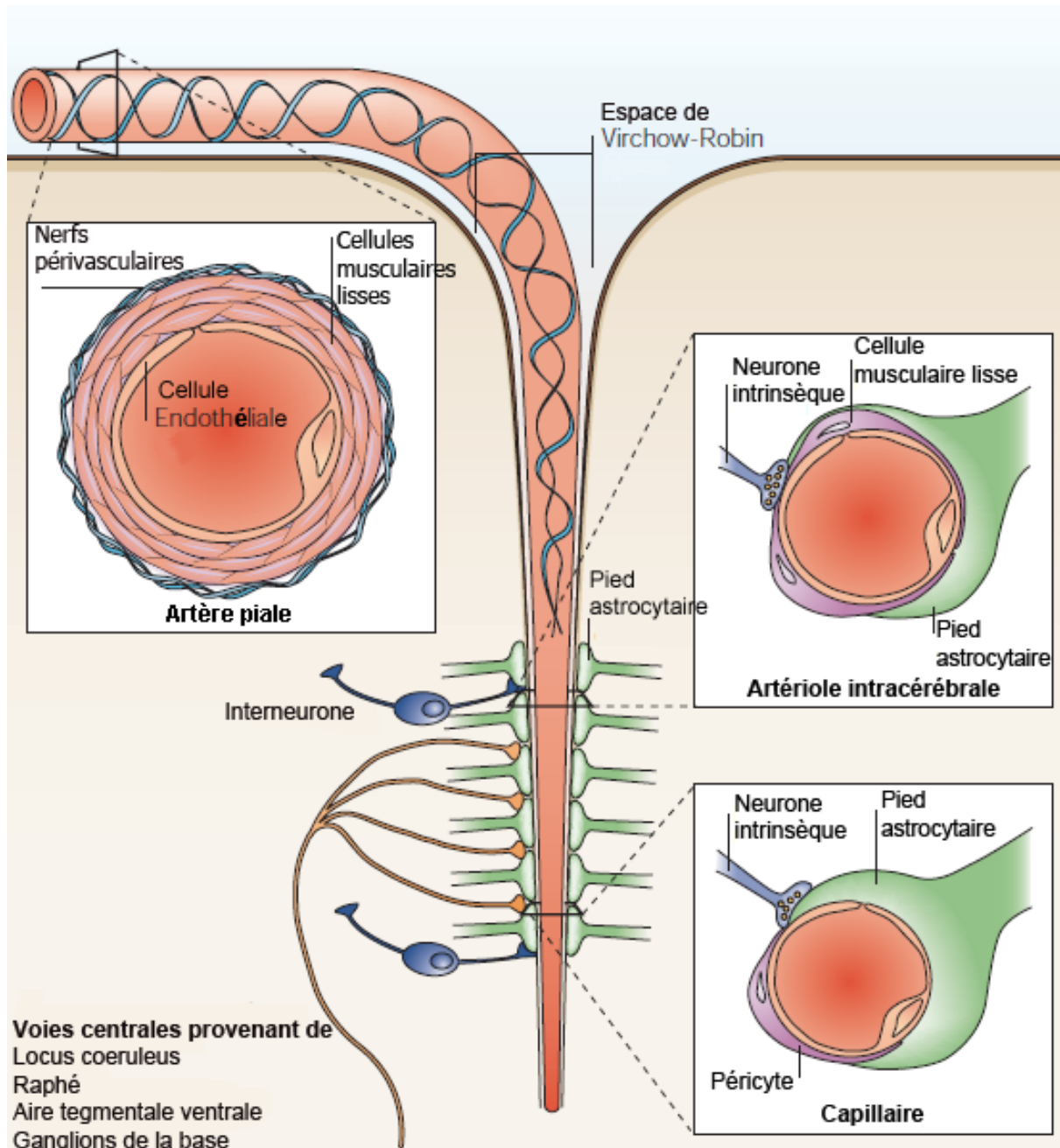


Figure 3 : Vascularisation cérébrale – anatomie et innervation. D'après Iadecola, 2004.

B. Interactions au sein de l'UNGV

Les trois compartiments de l'UNGV sont non seulement liés au plan physique, puisqu'ils vont partager le même environnement, mais également au plan fonctionnel, les différentes interactions qu'ils établissent étant indispensables au fonctionnement basal et au maintien de l'homéostasie (del Zoppo, 2009a, 2010). Ces interactions peuvent être résumées ainsi (figure 4, d'après Lok et al., 2007) :

- Les interactions entre neurones et cellules gliales sont indispensables à la transmission du message nerveux, notamment par la libération et la recapture des neurotransmetteurs dans la fente synaptique ;
- Les interactions entre neurones et cellules endothéliales établissent un couplage hémodynamique et sont indispensables à l'adaptation du flux sanguin en fonction des besoins métaboliques du tissu cérébral ;
- Les interactions entre cellules gliales et cellules endothéliales vasculaires sont indispensables au maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique.

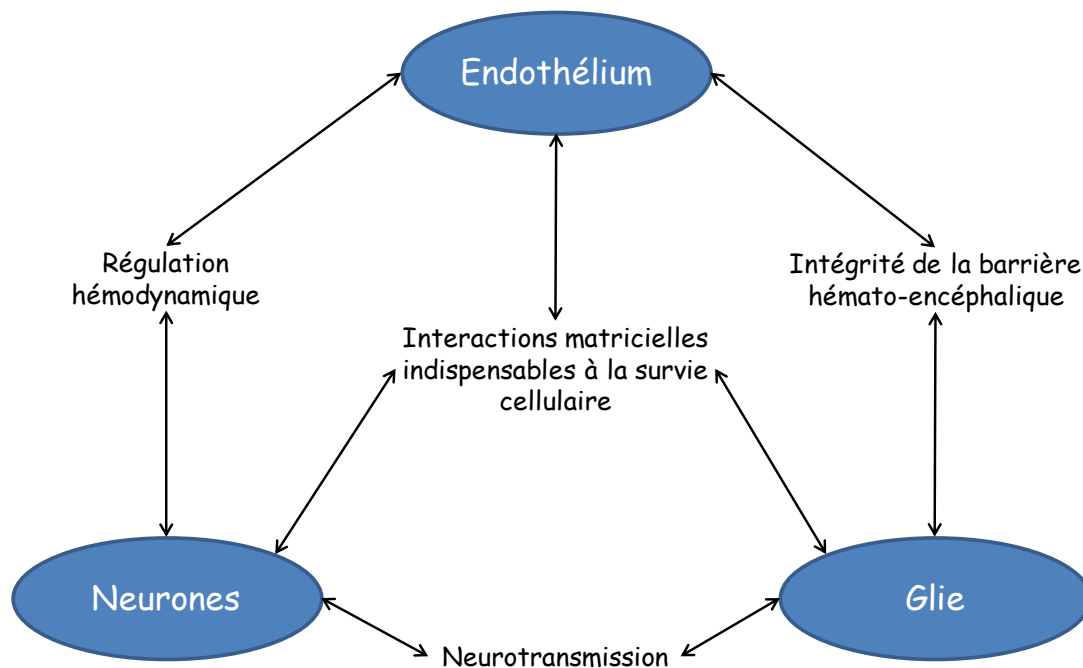


Figure 4: Interactions au sein de l'unité neuroglivovasculaire. D'après Lok et al., 2007.

1. Neurotransmission

Les astrocytes modulent la neurotransmission en agissant sur la structure même des réseaux neuronaux. Les interactions entre astrocytes et neurones interviennent dans la synaptogénèse par la libération de facteurs de croissance comme le Brain-Derived Growth Factor (BDNF), le Nerve Growth Factor (NGF), le PDGF β ou le Transforming Growth Factor β (TGF β). Les astrocytes sont également impliqués dans le développement axonal et la migration des neuroblastes, pour lesquels ils assurent un rôle de guide (Nedergaard et al., 2003; Sofroniew et Vinters, 2010).

Les astrocytes vont également moduler la neurotransmission en régulant l'activité synaptique. *In vitro*, la déconnection du réseau astrocytaire conduit à observer une activité et

une excitabilité synaptiques majorées et anarchiques (Pannasch et Rouach, 2013). Les mécanismes sous-tendant cette régulation commencent à être mieux connus. Il a été montré que l'activité neuronale génère des flux calciques intra-astrocytaires entraînant, en réponse à cette activité, la libération par les astrocytes de messagers neuroactifs (glutamate, purines, GABA...) qui vont moduler la transmission du message nerveux. Les astrocytes possèdent également la capacité de recapter l'excès de potassium extracellulaire par l'intermédiaire de canaux potassiques rectifiants entrants, et de le redistribuer aux astrocytes voisins permettant ainsi de maintenir l'excitabilité neuronale. Ils peuvent aussi recapter des neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique. Enfin, les astrocytes fournissent aux neurones le « carburant » nécessaire au fonctionnement synaptique, sous forme de lactate issu de la dégradation du glucose capté dans la circulation sanguine (Pannasch et Rouach, 2013).

2. Régulation du débit sanguin cérébral

i. Autorégulation et couplage hémodynamique

Les mécanismes d'autorégulation permettent les modifications actives de calibre des vaisseaux sanguins cérébraux en réponse aux variations de pression intraluminale et de flux. La relaxation ou la vasoconstriction qui en résultent sont la conséquence d'une communication complexe, par l'intermédiaire de médiateurs vasoactifs, entre les cellules musculaires lisses, l'endothélium et le parenchyme cérébral. Ce phénomène permet le maintien d'un débit sanguin constant en dépit des variations de pression artérielle systémique, dans un intervalle de 60 à 160 mm Hg (Cipolla, 2009). Les stimuli contrôlant ce mécanisme peuvent être d'origine extrinsèque (origine neuronale ou humorale par exemple) ou intrinsèque.

Il existe un couplage entre activité neuronale, et plus largement besoins métaboliques du parenchyme, et débit sanguin cérébral. L'augmentation de l'activité cérébrale entraînera une hyperhémie fonctionnelle. Les artères de gros calibre reçoivent une innervation dite extrinsèque, assurée par le système nerveux sympathique et permettant une régulation globale. Les artérioles et capillaires reçoivent au contraire une innervation intrinsèque issue des neurones voisins et permettant une adaptation du débit aux besoins métaboliques locaux (Iadecola, 2004). Les neurones et astrocytes voisins jouent également un rôle, plus particulièrement au niveau des artérioles perforantes (Koehler et al., 2009), notamment par la libération d'agents vasoactifs.

Différents messagers, de nature variée, interviennent dans ce couplage : par exemple l'adénosine issue de l'utilisation de l'ATP, à action vasodilatatrice, la pression partielle en dioxygène, certains neurotransmetteurs libérés à la synapse comme l'acétylcholine, ou les variations de concentrations en potassium extracellulaire. Ils agiront sur le tonus vasculaire de manière directe ou indirecte, c'est-à-dire en induisant la production de médiateurs vasoactifs (Palomares et Cipolla, 2011).

ii. Médiateurs vasoactifs

Les médiateurs vasoactifs peuvent être produits par les cellules endothéliales elles-mêmes, par les neurones ou les cellules gliales. Les principaux médiateurs vasodilatateurs sont (i) le monoxyde d'azote (NO) produit par la NO-synthase (NOS), (ii) la prostacycline (PGI₂) résultant de l'activation de la phospholipase A2 et des cyclo-oxygénases, et (iii) le facteur dépolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF, ou Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor), dont la nature exacte n'a pas encore été élucidée. Les endothélines sont de puissants vasoconstricteurs libérés par la cellule endothéliale et permettant de contrer l'action des médiateurs vasorelaxants (Cipolla, 2009).

Il existe trois isoformes de la NO-synthase : la NOS neuronale (nNOS ou NOS-1), la NOS inductible (iNOS ou NOS-2), et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS-3). Seules les NOS 1 et 3 sont exprimées constitutivement et leur activation est calcium-dépendante. L'expression de la NOS-2 est induite par les stimuli pro-inflammatoires. Cet isoforme a la particularité d'être constitutivement actif, et le NO produit aura un impact délétère : formation de peroxy-nitrites et majoration du stress oxydant. En conditions physiologiques, le NO issu de l'activité de la NOS neuronale intervient dans la transmission synaptique et dans la régulation du débit sanguin cérébral. Son impact sur ce dernier paramètre est mineur par rapport au NO produit par la NOS endothéliale (Forstermann et Sessa, 2011).

Le NO résulte de la transformation de L-arginine en L-citrulline en présence de NADPH. Au niveau endothélial, il va ensuite diffuser vers la cellule musculaire lisse et activer la guanylate cyclase. L'augmentation de la production de GMP cyclique aboutit au final à la relaxation (figure 5). Le principal mécanisme régulant l'activité de la NOS endothéliale est l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, sous l'influence de divers stimuli : médiateurs (acétylcholine, sérotonine...), stimulus mécanique (stress de cisaillement) (Davignon et Ganz, 2004).

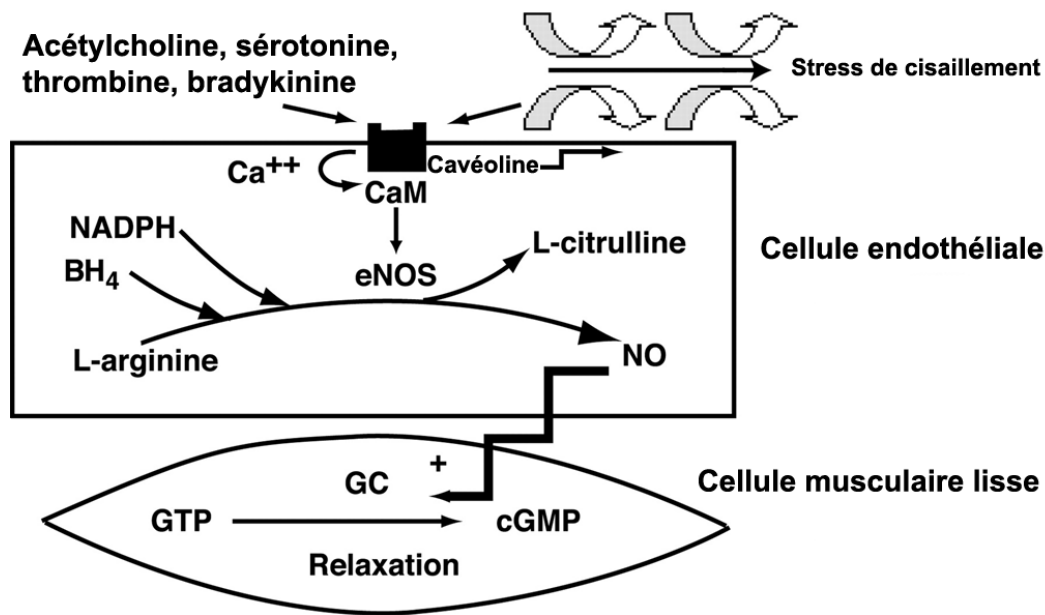


Figure 5 : Régulation de l'activité de la NOS endothéliale. D'après Davignon et Ganz, 2004.

3. Barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) permet de limiter la diffusion de substances exogènes dans le système nerveux central, sur la base de la polarité et de l'hydrophilie des molécules (Hawkins et Davis, 2005). La BHE est constituée de quatre éléments distincts : les cellules endothéliales, la membrane basale des vaisseaux sanguins, les péricytes et les pieds astrocytaires (figure 6). L'intégrité de la BHE résulte d'interactions étroites entre ces différents acteurs.

Elle dépend des caractéristiques particulières de l'endothélium cérébral (Hawkins et Davis, 2005; Lok et al., 2007) : absence de fenestrations, transport intracellulaire réduit et existence de jonctions serrées limitant le flux paracellulaire. Ces jonctions serrées se situent à l'apex des cellules endothéliales, liant de façon continue les cellules endothéliales à leurs voisines. Elles se caractérisent par la présence de protéines membranaires spécifiques, indispensables à l'établissement de la jonction : occludines, claudines (majoritairement claudine-5) et molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM). Des protéines cytoplasmiques associées à la membrane sont également impliquées, comme les zonula occludens-1, 2 et 3. Elles participent au maintien de l'intégrité de la jonction et interagissent avec les claudines et le cytosquelette (Luissint et al., 2012). L'assemblage des jonctions serrées se fait sous l'influence des péricytes et astrocytes voisins.

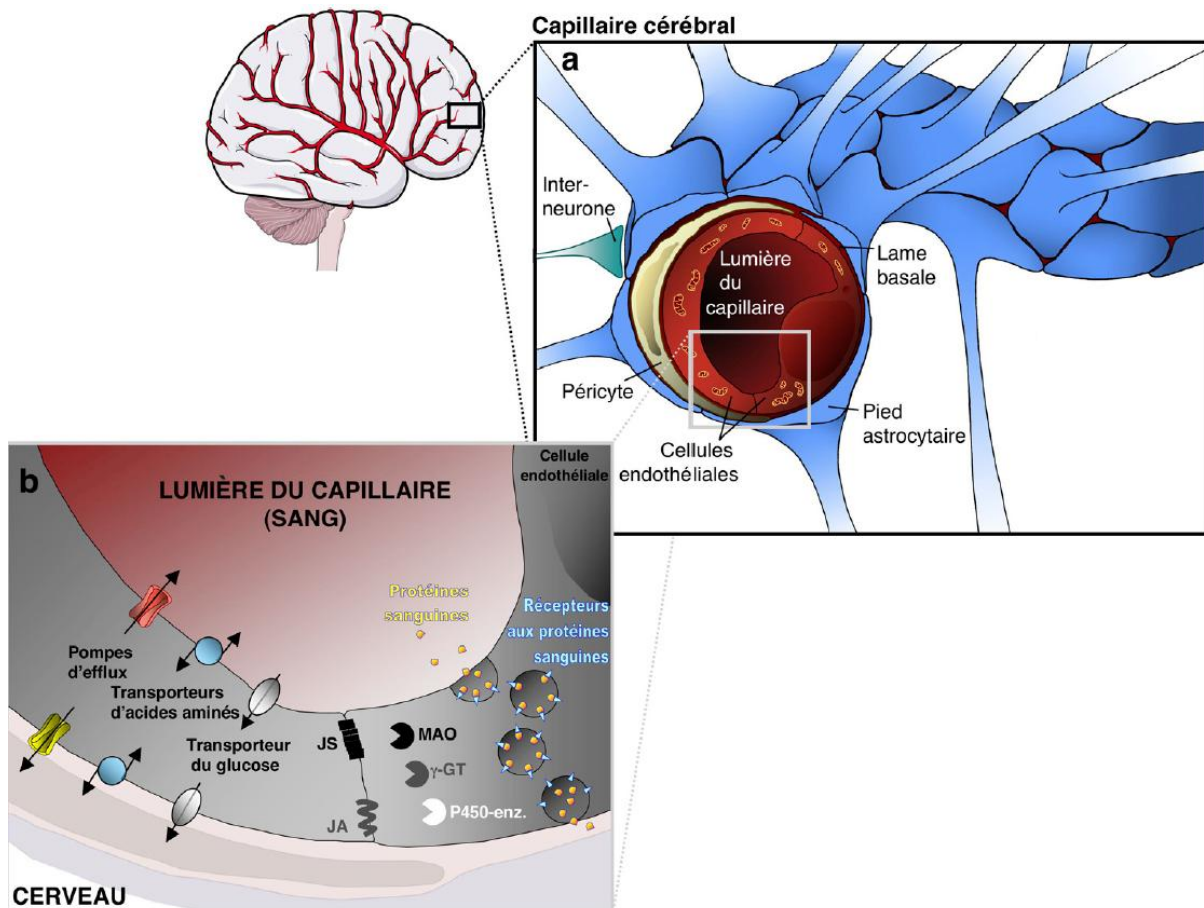


Figure 6 : Anatomie de la BHE. D'après Bérézowski et al., 2012.

Les astrocytes participent à la constitution et au maintien de ces jonctions par la libération de différents médiateurs, notamment le Glial cell Derived Neurotrophic Factor (GDNF) et le TGF β . Les péricytes vont préserver la BHE par une action anti-apoptotique ciblant les cellules endothéliales (Ballabh et al., 2004). Par ailleurs, les astrocytes et péricytes interviennent dans la synthèse des constituants de la lame basale, laminine, fibronectine, collagène de type IV et protéoglycanes à héparane sulfate qui va constituer une deuxième barrière physique. Enfin, ils vont intervenir sur la régulation de la perméabilité vasculaire. Ils vont influencer l'expression par les cellules endothéliales de transporteurs permettant l'apport de nutriments : pompes ioniques, transporteurs membranaires pour le glucose, le lactate, la transferrine... et de systèmes d'efflux membranaires à visée de détoxification : glycoprotéine-P, transporteurs membranaires de la famille des MRPs (Multidrug Resistance-associated Proteins) par exemple (Ballabh et al., 2004; Daneman, 2012).

C. L'UNGV cible de l'ischémie cérébrale

Les interactions décrites précédemment interviennent dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, mais également dans la transmission des signaux secondaires à l'ischémie. C'est l'UNGV dans son ensemble qui sera affectée lors d'une ischémie cérébrale. Les dommages cellulaires apparaissent dès les premières minutes suivant l'occlusion vasculaire, et évoluent au cours du temps, par étapes successives, pour constituer une cascade physiopathologique (Dirnagl et al., 1999; Moskowitz et al., 2010; Xing et al., 2012) (figure 7). L'intensité des dommages va notamment dépendre de la sensibilité à l'ischémie du territoire cérébral concerné, des types cellulaires le constituant et de leur proportion relative, et de la perfusion résiduelle permettant la subsistance des cellules situées dans la zone de pénombre.

1. Mécanismes physiopathologiques précoces

i. Excitotoxicité

Dans la cellule, la consommation d'ATP continue malgré l'arrêt des apports sanguins, et les stocks s'épuisent rapidement. Les processus énergie-dépendants s'arrêtent petit à petit, notamment les pompes ioniques membranaires. La pompe Na^+/K^+ -ATPase s'arrête progressivement, et en parallèle l'échangeur membranaire $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ voit son activité diminuer. Une autre conséquence majeure est la diminution d'activité des systèmes de recapture, entraînant notamment l'accumulation de glutamate dans la fente synaptique. La stimulation prolongée des récepteurs canaux AMPA et NMDA provoque une entrée massive de calcium et sodium, l'eau suivant passivement. Cela entraîne l'apparition d'un œdème cytotoxique. L'accumulation intracellulaire de calcium va provoquer l'activation de voies cataboliques calcium-dépendantes : lipases, protéases et nucléases participant à la dégradation des membranes et acides nucléiques ; enzymes produisant substrats et réactifs réagissant pour donner des espèces radicalaires, comme la NOS neuronale ou la phospholipase A2. Ce phénomène d'excitotoxicité concerne majoritairement les neurones.

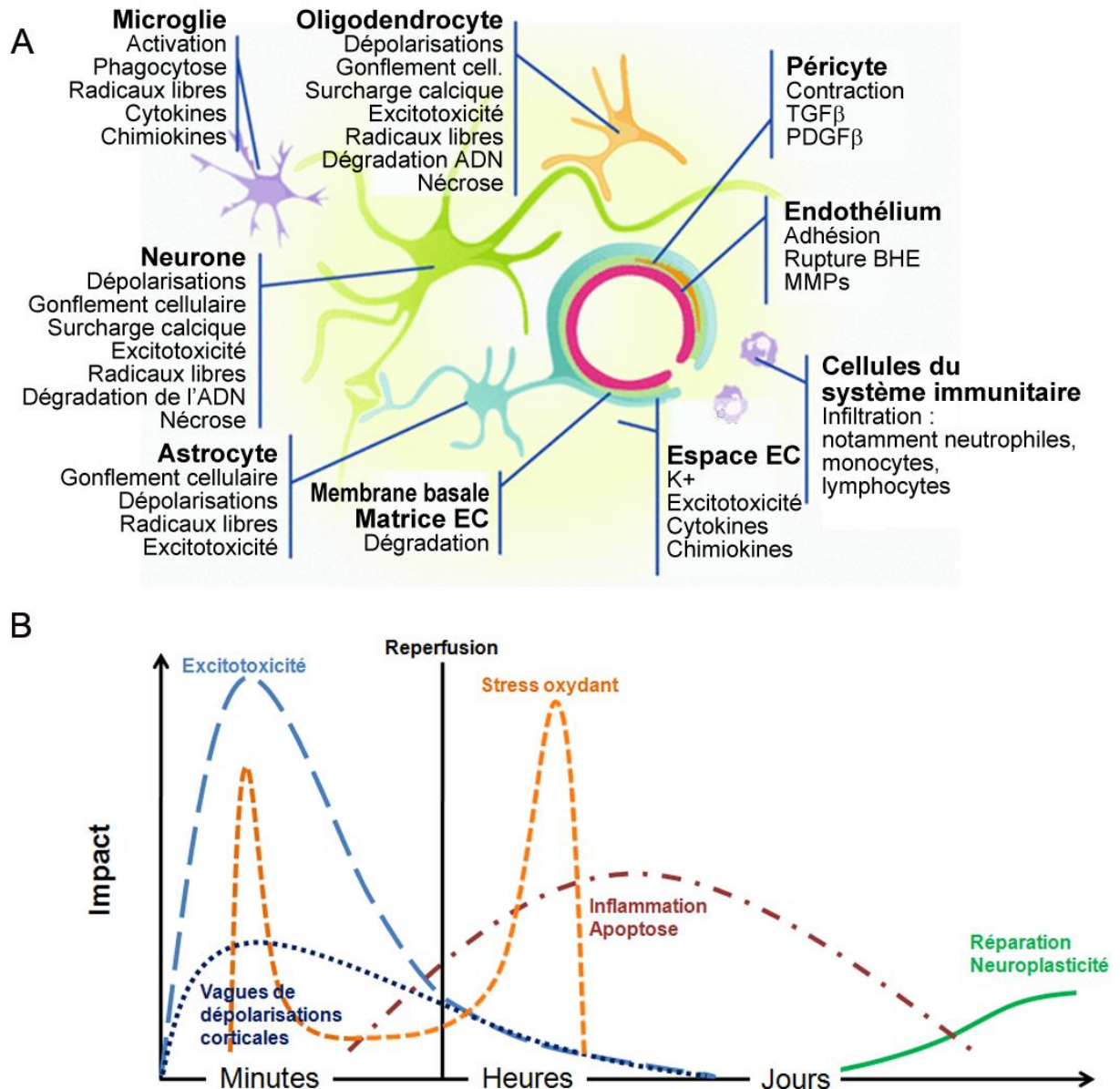


Figure 7 : Physiopathologie de l'ischémie cérébrale. A : Impact sur l'UNGV. EC = extracellulaire (modifié d'après Dirnagl, 2012). B : Cascade physiopathologique (d'après Dirnagl et al., 1999).

ii. Vagues de dépolarisations corticales

Parallèlement au stress glutamatergique apparaît un autre phénomène toxique, au niveau tissulaire cette fois. Alors que dans le cœur de l'ischémie, la déplétion métabolique est telle que la repolarisation membranaire est impossible (ces cellules sont d'ailleurs promises à une mort rapide par nécrose), dans la zone de pénombre, les cellules ont une survie prolongée grâce à la perfusion résiduelle qui permet un fonctionnement cellulaire *a minima*. Des vagues successives de dépolarisation/repolarisation surviennent alors spontanément, se propageant

lentement (quelques millimètres par minute) de cellule en cellule. Les neurones comme les cellules gliales sont concernés (Heiss, 2012). Ce phénomène de vagues de dépolarisations corticales (cortical spreading depolarizations) débute précocement et peut durer jusqu'à quelques jours. Il ajoute un stress métabolique supplémentaire, la consommation d'énergie étant indispensable à la repolarisation membranaire, et participe ainsi à l'extension de la zone infarctée. Chez l'animal, il a été démontré qu'une seule vague de dépolarisation corticale était susceptible d'augmenter l'aire d'hypoperfusion sévère de 20 % (Shin et al., 2006).

2. Mécanismes physiopathologiques « retardés »

Bien que les conséquences délétères du stress oxydant et de l'inflammation post-ischémique ne deviennent significatives que quelques heures après le début de l'ischémie, ces mécanismes sont initiés dès les premières minutes d'arrêt des apports sanguins. Ils sont par ailleurs interdépendants l'un de l'autre, et ont la particularité d'être amplifiés par la reperfusion.

i. Initiation

La mort rapide des cellules du cœur de l'ischémie constitue un premier stimulus. Les cellules vont libérer des particules appelées DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns, ou motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires), de nature variée : acides nucléiques, protéines comme le fibrinogène, la protéine nucléaire HMGB1 ou les protéines de choc thermique. Les DAMPs se fixent aux récepteurs de type Toll (Toll-like receptors ou TLR), exprimés par toutes les cellules du système nerveux central (Hanke et Kielian, 2011). Ils ont pour fonction première de reconnaître des motifs moléculaires conservés chez les agents pathogènes. L'activation des récepteurs de type Toll entraîne la mise en jeu de facteurs de transcription comme NFκB et AP-1, ayant pour conséquence l'expression de gènes pro-inflammatoires et pro-apoptotiques (Macrez et al., 2011; Zhang et al., 2012).

Parallèlement à cela, l'hypoxie, la pénurie de substrats et l'influx calcique vont entraîner des modifications métaboliques importantes. L'isoforme neuronal de la NO-synthase et le système xanthine-déshydrogénase/xanthine-oxydase vont produire des radicaux libres, NO et peroxydes. Ces espèces réactives constituent, comme les DAMPs, un autre signal activateur promouvant la transcription de gènes pro-inflammatoires et pro-apoptotiques.

Enfin, comme décrit précédemment, les cellules microgliales vont acquérir un phénotype activé. L'activation microgliale va débiter très précocement, et fait intervenir différentes voies de transduction, notamment les voies dépendant des MAP-kinases (p38, c-Jun, ERKs), et les voies dépendant de NF κ B et AP-1 (Yenari et al., 2010). La réaction microgliale est maximale 24 à 48 heures après ischémie, et peut perdurer plusieurs jours à plusieurs semaines.

Ces trois mécanismes conduisent à la transcription de gènes et à la mise en jeu de protéines impliquées dans les cascades inflammatoire et oxydative (Xing et al., 2012; Yenari et al., 2010) :

- cytokines à action pro-inflammatoire (TNF α , IL-1 β ...) et anti-inflammatoire (IL-10) ;
- facteurs chimiotactiques pour les cellules du système immunitaire : MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1 α) ;
- enzymes à action protéolytique : métalloprotéases (MMPs) ;
- espèces réactives de l'oxygène sous l'action de la NADPH-oxydase et des isoformes inductibles de la cyclo-oxygénase (COX-2) et de la NO synthase (NOS-2).

ii. Mise en jeu de la réaction inflammatoire

Le pic de sécrétion des cytokines et chimiokines survient quelques heures après l'ischémie. Les deux principales cytokines à rôle pro-inflammatoire, sécrétées par les trois compartiments de l'unité neuroglivasculaire, sont l'IL-1 β et le TNF α . Sous leur influence, les cellules endothéliales vont exprimer à leur surface des molécules d'adhésion : ICAM-1, VCAM, E-sélectine et P-sélectine, et les leucocytes les intégrines correspondantes. L'expression des protéines d'adhésion est maximale après 12 à 24 heures (Ge et al., 2000). Guidés par les chimiokines libérées en parallèle par les neurones (MCP-1, MIP-1 α ...), les leucocytes vont s'accumuler dans les capillaires cérébraux. La formation d'amas cellulaires, auxquels vont s'ajouter des plaquettes activées, va empêcher une reperfusion correcte : c'est le phénomène de no-reflow. Les leucocytes adhérents vont pouvoir également migrer à travers l'endothélium et pénétrer le parenchyme cérébral (Amantea et al., 2009; Frangogiannis, 2007) (figure 8). Les polynucléaires neutrophiles sont les premiers à infiltrer le parenchyme dans les heures suivant l'ischémie, l'infiltration est maximale à 24 heures. Ils sont au fur et à mesure remplacés par les macrophages et les lymphocytes B et T, qui deviennent majoritaires après quelques jours (del Zoppo, 2009b). Les leucocytes infiltrés dans le parenchyme vont participer à l'extension des lésions par la libération de cytokines pro-inflammatoires,

d'espèces radicalaires et de métalloprotéases qui vont dégrader la matrice extracellulaire (Dumas et Pouliot, 2009; Macrez et al., 2011).

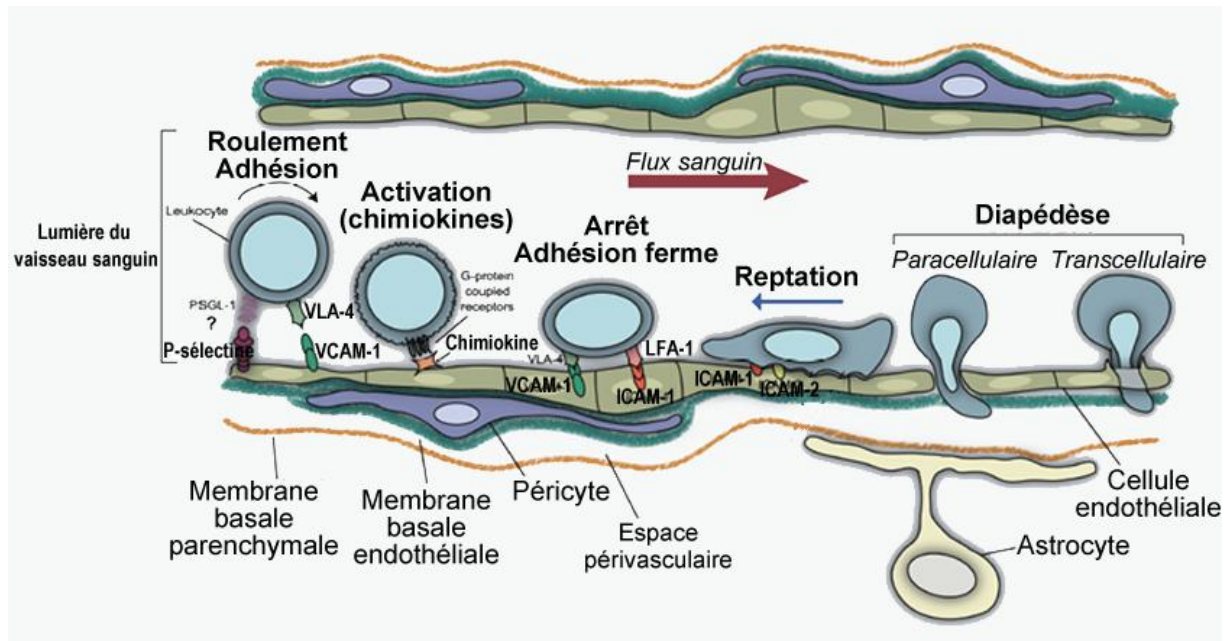


Figure 8 : Adhésion et infiltration leucocytaire (d'après Greenwood, 2011).

iii. Effecteurs du stress oxydant

Les espèces radicalaires sont produites physiologiquement en très petites quantités, et exercent des fonctions de messager. Elles interviennent notamment dans la régulation du tonus vasculaire, dans les voies de signalisation hypoxie-dépendantes et dans la production d'érythropoïétine (Chen et al., 2011). L'enzyme clé est la NADPH-oxydase, seule enzyme de l'organisme dont la fonction physiologique est la production d'espèces radicalaires. Sept isoformes ont pour le moment été identifiées, et résultent de l'assemblage de 6 sous-unités. Les NADPH-oxydases sont exprimées par tous les compartiments cellulaires de l'unité neuroglivasculaire, principalement au niveau vasculaire, et par les polynucléaires neutrophiles. Elles sont responsables de la production d'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Il existe dans la cellule d'autres sources d'espèces radicalaires : les oxydases dont la xanthine-oxydase productrices d'hydroperoxyde H_2O_2 , les NOS productrices de $NO^{\cdot}$, et la mitochondrie. L'épuisement des stocks cellulaires d'ATP et l'hypoxie prolongée vont entraîner une dysfonction mitochondriale, caractérisée par l'arrêt des phosphorylations oxydatives et par une surproduction d'espèces radicalaires, auxquelles la mitochondrie est elle-même très sensible (Chen et al., 2011; Kleikers et al., 2012).

Ces espèces radicalaires sont extrêmement instables et donc extrêmement réactives, elles vont réagir entre elles pour former de nouveaux radicaux libres. L'anion superoxyde se combine au NO pour former le peroxynitrite, ou est transformé en hydroperoxyde par addition de deux protons et deux électrons. L'hydroperoxyde est clivé en présence de fer par la réaction de Fenton, formant des radicaux hydroxyles HO[•]. Le peroxynitrite et le radical hydroxyle vont interagir avec les constituants cellulaires aux alentours. Les conséquences sont larges : dénaturation et fragmentation des acides nucléiques par oxydation, et des protéines par nitration et oxydation entraînant une perte de fonction. Les lipides sont dégradés par le phénomène de peroxydation lipidique, avec pour conséquence notamment une perte de fluidité puis une rupture des membranes. La libération du fer labile intracellulaire, par dégradation des vésicules de stockage, va favoriser la production d'hydroxyle.

3. Mort neuronale

La déplétion des stocks énergétiques, la perte des gradients ioniques membranaires et la dégradation des structures cellulaires, qui va déborder les systèmes de protection et de réparation, vont conditionner le devenir des neurones et conduire à la nécrose ou à l'apoptose. Selon l'intensité et la nature de ces stimuli, les cellules vont être orientées vers l'une ou l'autre voie. La nécrose survient principalement au cœur de l'ischémie, où la réduction du flux sanguin est la plus drastique, alors dans la zone de pénombre, le délai de survie supplémentaire lié à la réduction moindre de l'apport sanguin autorise la mise en place du processus d'apoptose (Xing et al., 2012). Par ailleurs, la destruction de la matrice extracellulaire et la perte des points d'ancrage peuvent diriger les cellules vers une forme de mort particulière, l'anoikis. La rupture de communication, ou tout au moins les perturbations dans le dialogue continu entre les différents constituants de l'unité neurogliovasculaire, jouent un rôle dans le devenir des cellules (figure 9).

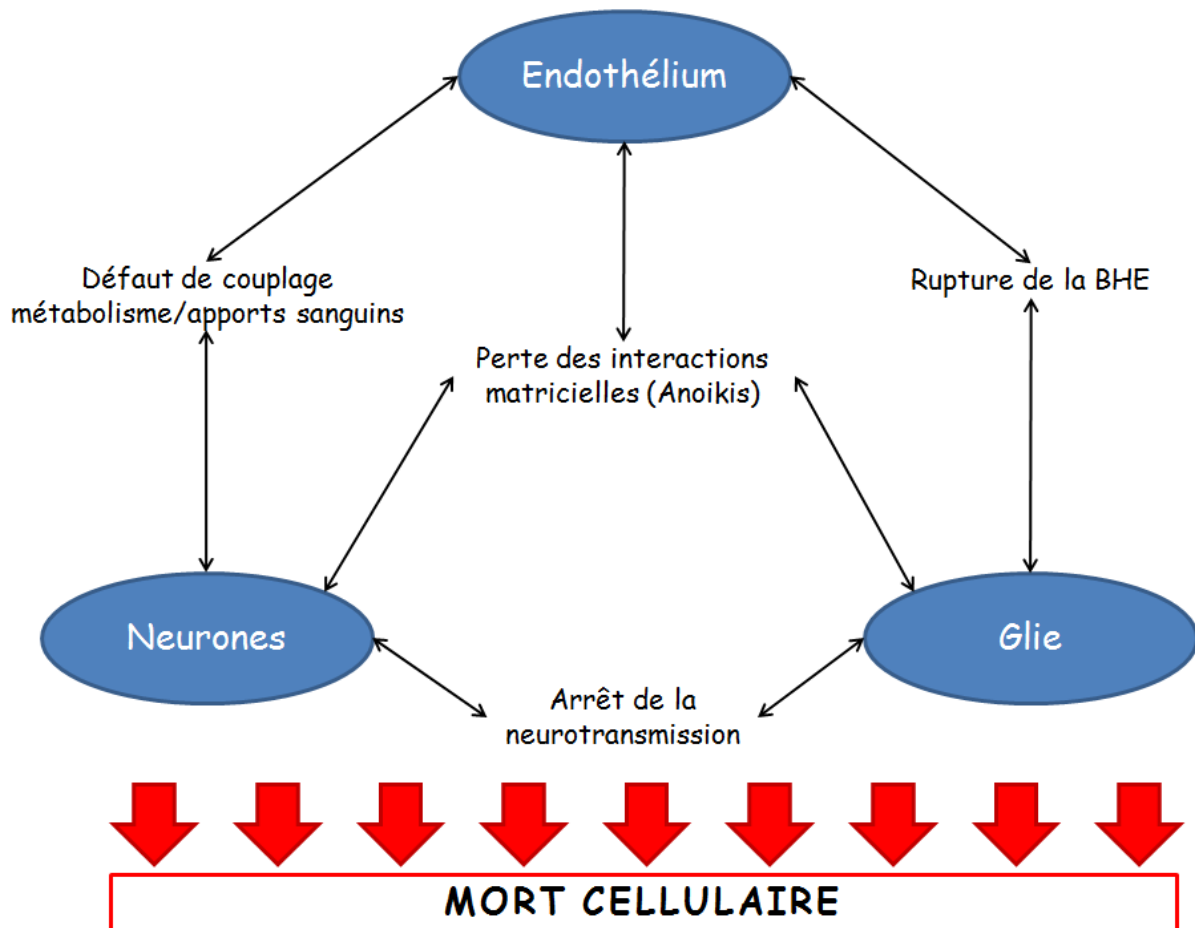


Figure 9 : Perte des interactions et mort cellulaire (modifié d'après Lok et al, 2007).

4. Impact sur le compartiment vasculaire

i. Impact sur la BHE

L'ouverture de la BHE est biphasique après ischémie-reperfusion, et liée aux lésions vasculaires (figure 10). L'ischémie enclenche une cascade réactionnelle délétère qui va aboutir à l'activation et à la lésion de l'endothélium, par différentes voies. L'excitotoxicité glutamatergique, l'épuisement métabolique et le défaut de fonctionnement des systèmes de transport ioniques et des pompes Na^+/K^+ -ATPases entraînent une accumulation d'eau et de sodium dans les cellules endothéliales et donc la constitution d'un œdème cytotoxique. La production précoce d'espèces radicalaires va en parallèle induire l'expression de métalloprotéases matricielles (MMP), qui vont provoquer une première ouverture, réversible, de la barrière (Khatri et al., 2012).

La reperfusion est à l'origine d'une deuxième ouverture, irréversible, de la BHE. La production de MMP *in situ* par les cellules du parenchyme et par les neutrophiles apportés par

la reperfusion constitue une deuxième salve lésionnelle et majeure la dégradation de la lame basale et de la matrice extracellulaire (Yang et Rosenberg, 2011). La perméabilité paracellulaire est majorée, en lien avec l'altération des jonctions serrées. Cette deuxième phase d'ouverture conduit à la constitution d'un œdème vasogénique (Khatri et al., 2012).

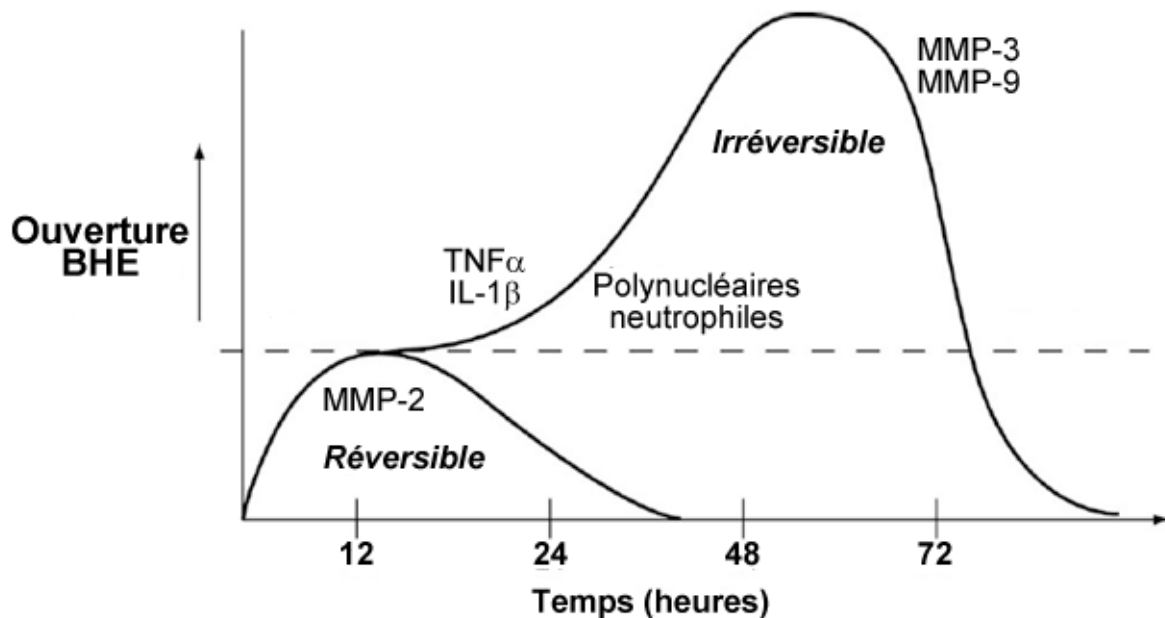


Figure 10 : Ouverture biphasique de la BHE (modifié d'après Yang et Rosenberg, 2011).

ii. Impact hémodynamique

L'ischémie-reperfusion induit un découplage entre activité neuronale et flux sanguin, en raison de l'altération fonctionnelle vasculaire et de la diminution du métabolisme : l'intensité des stimuli diminue comme la capacité de réponse des vaisseaux. Le dialogue entre neurones, glie et vaisseaux est rendu d'autant plus difficile que les réseaux de communication sont désorganisés et la matrice extracellulaire qui structure ces réseaux est dégradée, sous l'action notamment des métalloprotéases (Dirnagl, 2012).

Au niveau vasculaire, l'impact fonctionnel se caractérise notamment par une perte des mécanismes d'autorégulation. L'impact se fait sentir au niveau musculaire lisse comme au niveau endothélial. Le tonus myogénique, qui correspond à la réponse contractile aux variations de pression intraluminale, est altéré. L'activité des canaux potassiques membranaires est perturbée. La capacité de relaxation endothéliale est également diminuée (Bastide et al., 2007). D'autre part, l'expression de la NOS endothéliale est augmentée de façon précoce et prolongée après ischémie-reperfusion. Elle va contribuer au maintien du flux

sanguin dans la zone de pénombre. Cette activation est contrée par la reperfusion elle-même, par une diminution de sensibilité à l'acétylcholine notamment, et par le découplage de l'enzyme, lié à la pénurie de son cofacteur la tétrahydrobioptérine (BH4). L'épuisement des stocks cellulaires de BH4 est dû à la consommation liée à l'activité de la NOS endothéliale, et à son oxydation par les radicaux libres produits suite à l'ischémie-reperfusion (Forstermann et Sessa, 2011). Ce découplage entraîne l'arrêt de la production de NO, remplacée par la production d'anion superoxyde (Palomares et Cipolla, 2011).

5. Plasticité : neurogénèse et angiogénèse

L'observation d'une récupération spontanée dans les semaines suivant un AVC implique l'existence de phénomènes de réparation et de plasticité permettant de réduire l'impact lésionnel. L'élimination des débris cellulaires, sous l'action notamment des métalloprotéases matricielles, fait place nette. Cela va permettre la neurogénèse, en favorisant la migration et l'établissement de nouvelles cellules guidées par les signaux émis par les cellules en souffrance. Les cellules souches neurales de la zone subventriculaire et du gyrus denté vont migrer à la périphérie de l'infarctus et se différencier en neurones matures (Arai et al., 2011; Xiong et al., 2010).

En parallèle, les cellules endothéliales vont proliférer à partir de vaisseaux existants en bordure de l'infarctus pour former de nouveaux vaisseaux, c'est le processus d'angiogénèse mis en place dès 3 jours après AVC. Des progéniteurs endothéliaux, issus de la moelle osseuse, sont également recrutés pour assurer la formation de vaisseaux sanguins *de novo*, c'est le processus de vasculogénèse. L'induction précoce de ces deux mécanismes permet de faciliter le guidage et la migration périvasculaire des neuroblastes, et d'assurer un apport métabolique aux cellules en maturation (Arai et al., 2011; Xiong et al., 2010).

II. Approches pharmacologiques classiques des accidents vasculaires cérébraux

A. Traitement préventif

On distingue classiquement les facteurs de risque non modifiables et les facteurs de risque modifiables, c'est-à-dire accessibles à une intervention thérapeutique. Parmi les principaux facteurs de risque non modifiables, on peut citer le sexe masculin, l'âge et l'antécédent familial d'AVC. Concernant les facteurs de risque modifiables, il convient de

distinguer les facteurs liés à l'environnement et les facteurs inhérents au patient (Kokubo, 2012).

Les principaux facteurs liés à l'environnement sont la consommation de tabac, d'alcool, la sédentarité et un régime alimentaire déséquilibré. L'intervention thérapeutique consistera en premier lieu en l'éducation du patient et en la mise en place de règles hygiéno-diététiques adaptées (régime alimentaire, activité physique...). Ce type d'intervention peut également être utile dans la prise en charge des facteurs de risque vasculaire inhérents au patient : surpoids, dyslipidémie, hypertension artérielle, diabète de type 2, fibrillation auriculaire et autres troubles du rythme cardiaque emboligènes notamment. Il est intéressant de noter la progression, sur les 20 dernières années, des facteurs de risque liés au syndrome métabolique (Bejot et al., 2009b). Si les mesures hygiéno-diététiques ne suffisent pas à maîtriser ces facteurs de risque, différents moyens pharmacologiques sont disponibles :

- Anti-coagulants (anti-vitamine K, inhibiteurs de facteurs vitamine K-dépendants) et anti-agrégants plaquettaires (aspirine) pour la prise en charge du risque thrombo-embolique ;
- Anti-hypertenseurs pour la régulation tensionnelle ;
- Médicaments hypoglycémisants pour la régulation glycémique ;
- Médicaments normolipémiants (statines, fibrates, ézétimibe) pour la prise en charge des dyslipidémies et la diminution du risque athérogène.

Ces médicaments, utilisés en prévention primaire, diminuent le risque de survenue d'un premier événement ischémique cérébral, et pour certains d'entre eux diminuent le risque de récurrence en prévention secondaire (Spence, 2010).

B. Traitement à la phase aiguë

1. Prise en charge hospitalière

L'admission des patients en Unité Neuro-Vasculaire permet la réalisation d'un bilan rapide et une prise en charge symptomatique et spécifique. L'évaluation du déficit neurologique est réalisée à l'admission grâce à l'échelle de score du National Institute of Health (Brott et al., 1989). Elle évalue différents paramètres, dont le niveau de conscience, la vision, la motricité et la sensibilité. Chaque critère est coté de 0, s'il y a absence de déficit, à 4 au maximum, en cas de déficit complet pour le critère testé. La somme des cotations des différents critères donne le score final, le déficit sera considéré comme sévère pour une valeur

supérieure à 25. Cette échelle a deux intérêts majeurs : lorsqu'elle est mesurée dans les premières heures, elle a une valeur prédictive du pronostic fonctionnel du patient, et va permettre de suivre à long terme l'évolution de l'état neurologique de celui-ci, une augmentation du score signant une aggravation (Brott et al., 1989). La valeur du score mesurée à l'admission va conditionner la suite de la prise en charge, et notamment le choix du traitement spécifique.

La prise en charge symptomatique est elle aussi mise en place dès l'admission du patient. Elle sera adaptée au cas par cas selon les symptômes présentés : traitement antalgique et antipyrétique en cas de douleurs ou de fièvre, traitement anti-épileptique en cas de crises convulsives, administration d'insuline en cas d'hyperglycémie ou de solutions concentrées de glucose en cas d'hypoglycémie, traitement anti-hypertenseur en cas d'hypertension artérielle, l'hypotension artérielle est elle traitée par expansion volémique avec succédané du plasma ou par administration de drogues vasoactives. Cette prise en charge symptomatique peut être nécessaire à la mise en place de thérapeutiques spécifiques de l'AVC ischémique.

Parmi ces thérapeutiques spécifiques, seul le traitement thrombolytique par altéplase est une stratégie pharmacologique, sur laquelle nous reviendrons en détail dans la partie suivante. Les autres thérapeutiques disponibles n'impliquent pas d'administration médicamenteuse. L'hypothermie est une stratégie prometteuse dont les effets neuroprotecteurs ont été établis *in vivo*. Elle fait actuellement l'objet d'une étude européenne de phase III, EuroHYP-1 (Cooling Plus Best Medical Treatment Versus Best Medical Treatment Alone for Acute Ischaemic Stroke, Schwab, 2013). L'utilisation de dispositifs mécaniques permettant le retrait du caillot offre également des perspectives intéressantes, notamment chez les patients non éligibles à la thrombolyse. Plusieurs dispositifs font l'objet d'une évaluation clinique (Hennerici et al., 2013).

Les traitements per os sont ensuite réintroduits progressivement. Un traitement de fond anti-thrombotique est débuté : aspirine, pouvant être associée au clopidogrel ou au dipyridamole, et héparine de bas poids moléculaire par voie sous-cutanée. Les facteurs de risque vasculaire sont ciblés par des traitements médicamenteux adaptés. La cause probable de l'AVC, lorsqu'elle peut être identifiée, sera prise en charge de façon adaptée : par exemple, une sténose carotidienne sera traitée par angioplastie, le risque emboligène lié à une fibrillation auriculaire sera prévenu par un traitement par anticoagulant oral...

2. Restauration du flux sanguin : thrombolyse par l'altéplase

Le seul traitement pharmacologique ayant fait preuve de son efficacité, c'est-à-dire pour lequel un bénéfice fonctionnel à 3 mois a été mis en évidence chez les patients traités, est le traitement par altéplase (ACTILYSE®). L'altéplase, ou rtPA, est un analogue recombinant de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Le tPA clive le plasminogène fixé au caillot en plasmine active qui va hydrolyser la fibrine, et donc dissoudre le caillot. La sécrétion endogène de tPA est assurée par les cellules endothéliales, en réponse à une occlusion vasculaire. Cette sécrétion est toutefois insuffisante pour permettre une lyse rapide du caillot, d'où l'intérêt d'un apport exogène afin de lever rapidement l'occlusion vasculaire. Le principal effet indésirable de l'altéplase, en lien avec son mécanisme d'action, est la transformation hémorragique symptomatique. Elle concerne 5 à 7% des patients, et est associée à une surmortalité (Lansberg et al., 2007; Wardlaw et al., 2012).

Initialement utilisé dans un délai de 3 heures après le début des symptômes, sur la base de larges études de cohorte (Larrue et al., 2000), l'altéplase est aujourd'hui autorisé dans les 4h30 suivant l'apparition du déficit neurologique, chez le patient âgé de moins de 80 ans sur la base des résultats de l'étude ECASS-III (European Cooperative Acute Stroke Study III – Hacke et al., 2008). Ce traitement permet en effet à 3 mois l'absence de handicap ou un handicap faible chez un patient pour 9 patients traités avant 3 heures, et chez un patient pour 15 traités entre 3 heures et 4h30, sans toutefois de bénéfice net quant à la mortalité globale (Lees et al., 2010; Wardlaw et al., 2012). Le bénéfice tiré du traitement thrombolytique est temps-dépendant. Plus le délai entre l'apparition des symptômes et l'administration du traitement est long, plus le bénéfice diminue, et plus le risque de transformation hémorragique augmente (Lees et al., 2010).

3. Possibilités d'optimisation thérapeutique

La mesure d'optimisation la plus évidente est l'élargissement de la fenêtre thérapeutique limitant l'utilisation de l'altéplase (Donnan et al., 2011). L'étude IST-3 (International Stroke Trial-3), dont les premiers résultats ont été publiés récemment (The IST-3 collaborative group, 2012), a été mise en place afin d'évaluer si l'extension de la fenêtre thérapeutique à 6 heures pouvait avoir un intérêt. L'administration entre 4h30 et 6 heures ne semble pas être associée à un sur-risque, mais ne semble pas non plus procurer de bénéfice supplémentaire. Les auteurs attribuent ces résultats décevants en partie à un manque de

puissance, le nombre de patients inclus ne correspondant qu'à la moitié de l'effectif prévu. Le recrutement de patients continue et permettra de confirmer ou non ces résultats.

Une autre mesure d'optimisation serait de sélectionner les patients selon la surface de la zone de pénombre (Donnan et al., 2011). L'évolution des techniques d'imagerie par résonance magnétique (IRM) ces dernières années, et leur utilisation de plus en plus fréquente à la phase aiguë de l'AVC, ont conduit à la mise au point de séquences permettant de visualiser la zone de pénombre. La zone de pénombre correspondrait en effet à la différence (« mismatch ») entre la zone hypoperfusée visualisable sur les images en séquence de perfusion et le cœur de l'ischémie visible en séquence de diffusion (Fisher et Albers, 2013). L'estimation de cette zone de pénombre, représentant le tissu cérébral « sauvable », pourrait permettre d'identifier les patients qui pourraient tirer un bénéfice du traitement thrombolytique, même au-delà de la fenêtre thérapeutique classique, et écarter ceux qui au contraire présentent un risque d'extension précoce et sévère de la lésion (Donnan et al., 2011; Fisher et Albers, 2013).

4. Autres agents fibrinolytiques

Etant donnés les limites et risques associés au traitement par altéplase, d'autres agents fibrinolytiques sont actuellement évalués à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale : le ténecteplase (METALYSE[®], indiqué dans l'infarctus du myocarde) et le desmotéplase (non commercialisé en France). Les résultats des études préliminaires semblent indiquer une efficacité comparable voire supérieure à l'altéplase, associée à un risque moindre de transformation hémorragique et une fenêtre thérapeutique plus large, jusqu'à 9 heures après le début des symptômes (Molina, 2011; Parsons et al., 2012). Ces molécules font actuellement l'objet d'études cliniques (von Kummer et al., 2012). Deux études de phase II sont en cours pour le ténecteplase : TEMPO-1 (TNK-tPA Evaluation for Minor Ischemic Stroke With Proven Occlusion – Hill et Coutts, 2012) et ATTEST (Alteplase-Tenecteplase Trial Evaluation for Stroke Thrombolysis – Muir, 2011). Pour le desmotéplase, une étude de phase II : DIAS-J (Clinical Study of Desmoteplase in Japanese Patients With Acute Ischemic Stroke – Lundbeck, 2010) et deux études de phase III sont en cours : DIAS-3 (Efficacy and Safety Study of Desmoteplase to Treat Acute Ischemic Stroke-3 - Lundbeck, 2008) et DIAS-4 (Efficacy and Safety Study of Desmoteplase to Treat Acute Ischemic Stroke-4 – Lundbeck, 2009).

C. Approches de neuroprotection

Lorsque le rétablissement du flux sanguin n'est pas envisageable ou inefficace par voie pharmacologique ou mécanique, il serait intéressant de disposer de stratégies de protection directe ciblant le tissu cérébral en souffrance. C'est là le but des approches de neuroprotection. La neuroprotection peut se définir comme « une stratégie, unique ou combinée, qui bloque, interrompt ou ralentit l'enchaînement d'évènements délétères biochimiques et moléculaires qui, sans intervention, aboutiraient à la constitution d'une lésion ischémique irréversible » (Ginsberg, 2008). Il est aujourd'hui estimé que plus de 1000 composés ont été testés dans cette optique, ce qui a donné lieu à environ 200 essais cliniques (Minnerup et al., 2012), mais jusqu'ici à aucune mise sur le marché effective.

1. Un cas d'école : le NXY-059

Le NXY-059 est un antioxydant et piège à radicaux libres. Il a été testé dans un premier temps chez l'animal, dans des modèles d'ischémie cérébrale transitoire et permanente chez différentes espèces : rat, lapin, primate (marmouset). Les études précliniques ont permis de mettre en évidence un effet neuroprotecteur marqué, avec diminution significative du volume lésionnel à l'appui. Chez le primate, cet effet était associé à une amélioration des symptômes moteurs et à une réduction de l'héminégligence (Green, 2008), symptômes fréquemment présents chez les patients ayant présenté un AVC. Par ailleurs, la tolérance était tout à fait satisfaisante, la fenêtre thérapeutique (4 heures) et les doses utilisées permettaient d'envisager une utilisation chez l'Homme (Green, 2008).

C'est sur cette base qu'ont été mises en place les études de phase III SAINT-I (Stroke-Acute Ischemic-NXY Treatment, 1700 patients) et SAINT-II (3200 patients), menées de mai 2003 à juin 2006. Ces études contrôlées, randomisées en double aveugle et contre placebo, incluaient des patients admis pour AVC ischémique dans les 6 heures suivant l'apparition des symptômes, puis suivis pendant 3 mois. Les doses utilisées étaient supérieures aux doses testées chez l'animal. Les patients éligibles à la thrombolyse recevaient également ce traitement. Les résultats de l'étude SAINT-I n'étaient positifs que concernant le critère d'évaluation primaire, la réduction de la sévérité du handicap à 3 mois. Ces résultats n'étaient pas reproduits dans l'étude SAINT-II. L'analyse poolée des résultats issus de ces deux études ne mettait en évidence aucun bénéfice du traitement comparé au placebo (Diener et al., 2008). Le développement clinique de cette molécule s'est donc arrêté net.

2. Les raisons de l'échec de cette approche

i. Le NXY-059...

Suite aux résultats décevants des études de phase 3, différentes hypothèses ont été émises (Green, 2008). Il a été proposé qu'une impureté dans la préparation pharmaceutique soit en réalité à l'origine de l'action neuroprotectrice du NXY-059, impureté qui n'aurait pas été présente dans la formulation galénique utilisée dans l'étude SAINT-II. Des critiques ont été formulées quant à la qualité du travail expérimental qui a servi de base au développement clinique du NXY-059, où l'efficacité du traitement aurait été surévaluée. Il apparaît toutefois que ces arguments ne sont pas valables (Bath et al., 2009; O'Collins et al., 2006), l'explication est donc à chercher ailleurs.

ii. Et les autres...

Le constat est clair : plus de 1000 stratégies de neuroprotection ont été testées à l'heure actuelle, plus de 200 essais cliniques ont été mis en place pour l'évaluation humaine, aucune n'a pour le moment fait preuve de son efficacité et n'a franchi le cap de la mise sur le marché (Minnerup et al., 2012). Quelles peuvent donc être les raisons de ces échecs répétés ? Le premier point est l'insuffisance de données. Idéalement, les effets neuroprotecteurs devraient être mis en évidence dans différents modèles d'ischémie cérébrale, chez différentes races d'animaux et reproduits par différentes équipes (Philip et al., 2009). De plus, dans la conception des études précliniques, certains aspects méthodologiques ne permettent bien souvent pas une translation directe à l'Homme (Philip et al., 2009; Sutherland et al., 2012), notamment concernant :

- 1) Le choix de la molécule : un mécanisme d'action trop ciblé ne permet pas de prendre en charge la complexité de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale ;
- 2) Le choix de la voie ou de la cible physiopathologique : son importance dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale chez l'Homme n'est pas nécessairement la même que dans les modèles animaux, et par conséquent son ciblage pas aussi bénéfique ;
- 3) Le choix du modèle d'ischémie cérébrale expérimentale, qui ne reflète pas nécessairement la réalité clinique : le mode (mécanique, thrombotique) et la durée d'occlusion (transitoire ou permanente), le territoire ciblé qui est généralement le territoire de l'artère cérébrale moyenne ;

- 4) Le choix des animaux, bien souvent une population très homogène, jeune, de sexe mâle et sans facteurs de risque vasculaire ;
- 5) Les choix méthodologiques : les études précliniques, par rapport aux études cliniques, se basent sur de petits effectifs, bien souvent sans randomisation ni travail en aveugle ; les conditions d'administration du traitement ne sont pas forcément facilement transposables à la clinique (voie et délai d'administration, posologie).

Devant l'hétérogénéité, notamment méthodologique, des nombreuses études précliniques de neuroprotection dans l'ischémie cérébrale, les difficultés de transposition à l'Homme apparaissent assez nettement. Un groupe d'experts académiques et industriels, le groupe STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) a émis des recommandations dernièrement mises à jour en 2009 (Fisher et al., 2009), et reprises dans le tableau 2.

Tableau 2 : Recommandations du comité STAIR. D'après Fisher et al., 2009.

<i>Recommandations initiales</i>	
1	Etude adaptée de la relation dose-réponse
2	Définition de la fenêtre thérapeutique sur un modèle adapté
3	Etudes reproductibles, en aveugle, avec contrôle des paramètres physiologiques
4	Evaluation fonctionnelle et histologique à la phase aiguë et à long terme
5	Etudes sur rongeurs en premier lieu, puis sur primates
6	Modèles d'occlusion permanente en premier lieu, puis modèles d'occlusion transitoire
<i>Recommandations additionnelles</i>	
	Calcul des effectifs nécessaires <i>a priori</i>
	Définition de critères d'inclusion et d'exclusion
	Randomisation des animaux et suivi en aveugle jusqu'au traitement des données
	Prise en compte des animaux exclus de l'étude
	Conflits d'intérêt et sources de financement de l'étude

Ces critères devraient permettre d'améliorer la qualité des études précliniques et également de faciliter la translation à l'Homme en cas d'efficacité avérée. Bath et collaborateurs ont été les premiers à évaluer l'efficacité du NXY-059 selon ces critères, et la

qualité des études précliniques au travers d'une méta-analyse réalisée après l'échec en phase clinique de cette molécule. Ils suggèrent que ce type d'analyse soit généralisé avant d'envisager le passage en phase clinique, afin d'évaluer les molécules de façon plus complète (Bath et al., 2009).

iii. Conséquences

Ces échecs répétés ont entraîné une remise en cause de l'approche expérimentale mais également de la stratégie pharmacologique de prise en charge de l'ischémie cérébrale à la phase aiguë, incitant à utiliser des approches à spectre plus large, ciblant plusieurs voies physiopathologiques plutôt qu'une seule, et ayant une action double, protectrice et réparatrice.

Par ailleurs, l'approche « classique » de l'Animal à l'Homme est discutée et une approche plus transversale et surtout bidirectionnelle existe désormais. On voit ainsi, à partir de l'observation de cohortes de patients suivis dans l'AVC, émerger des thérapeutiques qui semblent intéressantes dans l'AVC et dont on confirme les effets bénéfiques en les testant chez l'Animal avant de repasser spécifiquement dans cette indication chez l'Homme. C'est le cas de certaines des molécules dont nous allons discuter.

III. Une nouvelle approche pharmacologique dans l'ischémie cérébrale : l'approche pléiotrope

En pharmacologie, la notion de pléiotropie peut se définir comme la capacité d'une molécule à moduler différentes cibles, aboutissant à des effets variés. Ces effets additionnels diffèrent généralement de l'effet recherché, pour lequel la molécule a été mise au point et est utilisée en clinique. Ils sont généralement détectés après mise sur le marché, lors de l'utilisation de la molécule en population générale. Les molécules à action pléiotrope présentant des effets neuroprotecteurs intéressants dans l'ischémie cérébrale peuvent être réparties en deux catégories : les molécules utilisées dans le champ neurovasculaire, principalement en traitement préventif, et les molécules non utilisées en pratique clinique dans ce domaine (Minnerup et Schäbitz, 2009). Nous donnerons dans cette partie quelques exemples dans ces deux catégories, la liste n'étant bien sûr pas exhaustive.

A. Stratégies utilisées en traitement préventif

1. Anti-agrégants plaquettaires

Parmi les anti-agrégants plaquettaires disponibles, à l'heure actuelle seuls l'aspirine et son dérivé le diflunisal semblent exercer des effets pléiotropes. A doses faibles, inférieures aux doses anti-inflammatoires, l'aspirine inhibe de manière irréversible les cyclo-oxygénases plaquettaires, limitant ainsi la production du thromboxane A₂ à effet pro-agrégant. Il a également été mis en évidence que l'aspirine (i) limite la libération post-ischémique de glutamate *in vitro* et *in vivo* (Berger et al., 2008a; De Cristóbal et al., 2001; Moro et al., 2000) ; (ii) participe à la restauration des stocks d'ATP et limite la perte de fonction mitochondriale (De Cristóbal et al., 2001; De Cristobal et al., 2002) ; et (iii) exerce un effet anti-inflammatoire se traduisant par une inhibition de la translocation de NFκB, une diminution de l'expression de la NOS inductible (Moro et al., 2000). Le traitement par aspirine ne paraît par contre pas limiter l'infiltration leucocytaire et l'activité des MMP (Berger et al., 2008a; Bhatt et Addepalli, 2012).

In vivo, l'aspirine est neuroprotectrice et induit une diminution du volume lésionnel chez le rat soumis à ischémie cérébrale par occlusion mécanique de l'artère cérébrale moyenne, permanente ou transitoire, en traitement préventif comme en traitement post-ischémique (Berger et al., 2008a; De Cristóbal et al., 2001; Khayyam et al., 1999; Whitehead et al., 2007; Zheng et al., 2007). Un effet neuroprotecteur est également mis en évidence dans un modèle d'occlusion thrombo-embolique (Uddin et al., 2003). Parallèlement à cet effet tissulaire, le déficit neurologique est réduit, et l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique préservée (Berger et al., 2004; Bhatt et Addepalli, 2012; Wang et al., 2009). Cet effet neuroprotecteur est dose-dépendant, l'aspirine est efficace jusqu'à 6 heures après induction de l'ischémie (Khayyam et al., 1999; Zheng et al., 2007). Deux études chez le rat diabétique mettent également en évidence une réduction du volume lésionnel chez les animaux traités (Bhatt et Addepalli, 2012; Wang et al., 2009).

L'aspirine est largement utilisée en clinique en prévention primaire et secondaire des événements thrombo-emboliques. Dans l'AVC ischémique, elle est également utilisée à la phase aiguë. Elle permet de limiter le risque de récurrence, sans effet net sur le pronostic fonctionnel et la mortalité à moyen terme (ESO, 2009). Deux grandes études portant sur près de 40 000 patients ont montré l'intérêt de l'aspirine en prévention secondaire, avec une réduction significative du nombre de récurrences chez les patients traités. Cette action

préventive est liée à son action anti-agrégante, mais serait également liée à ses effets annexes (Hennekens et Dalen, 2013) dont ses effets anti-excitotoxiques, retrouvés chez l'Homme. Une diminution de la libération post-ischémique de glutamate a été mise en évidence chez les patients traités par aspirine, et était associée à un meilleur pronostic (Castillo et al., 2003).

2. Anti-hypertenseurs

Nous nous intéresserons ici à deux familles de molécules utilisées en clinique pour leurs propriétés anti-hypertensives par action sur le système rénine-angiotensine. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) bloquent le clivage de l'angiotensine I en angiotensine II. Les sartans sont des antagonistes du récepteur AT-1 à l'angiotensine II.

i. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion

Il a été montré que le traitement par IEC (i) exerce une action protectrice contre les effets cytotoxiques du glutamate et du fer, et limite la production d'espèces radicalaires *in vitro* (Ravati et al., 1999) ; (ii) réduit *in vivo* l'expression et l'activité cérébrales des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 (Liebetrau et al., 2005; Tanaka et al., 2007a) ; et (iii) induit une augmentation de l'expression du facteur de croissance BDNF et de son récepteur TrkB (Krikov et al., 2008).

Les études expérimentales menées chez le rongeur ne sont pas toujours en faveur de l'existence d'un effet neuroprotecteur. Un traitement préventif par IEC induit une réduction du volume d'infarctus chez le rat soumis à occlusion permanente de l'ACM, pour des durées de traitement variant de 7 jours (Okamoto et al., 2002; Tanaka et al., 2007a) à une injection unique 1 heure avant induction de l'ischémie (Ravati et al., 1999). La souche de rats SHR-SP semble également sensible aux effets neuroprotecteurs des IEC. Un traitement par IEC, qu'il ait été initié avant ou après survenue de l'AVC, permet une réduction du déficit neurologique, de l'œdème cérébral et une prolongation de la survie (Fujii et al., 1992; Yabuuchi et al., 1999). Par contre, chez le rat spontanément hypertendu et chez la souris, aucune modification du volume lésionnel n'est retrouvée, et le traitement par IEC n'exerce pas d'effet anti-oxydant (Hamai et al., 2006; Porritt et al., 2010).

Les IEC comptent parmi les anti-hypertenseurs les plus utilisés en clinique. Ils sont efficaces en prévention primaire et secondaire de l'AVC ischémique. L'implication clinique d'effets autres que ceux sur la régulation tensionnelle reste toutefois à évaluer. Une étude

rétrospective a mis en évidence un rôle protecteur cérébral des IEC en prévention primaire, avec une diminution de la sévérité et de la mortalité à court terme (28 jours) après un premier AVC (Chitravas et al., 2007). Deux grandes études cliniques, l'étude PROGRESS (Perindopril Protection Against Recurrent Stroke Study – Chapman et al., 2004; PROGRESS Collaborative Group, 2001) et l'étude HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation – Bosch et al., 2002) ont mis en évidence une diminution du risque de récurrence chez les patients traités respectivement par périndopril et ramipril en prévention secondaire, après un premier AVC (étude PROGRESS) ou un premier évènement cardiovasculaire (étude HOPE). Lorsqu'un AVC survenait, la sévérité et le risque de mortalité associés étaient également plus faibles.

ii. Les sartans

Les données concernant les effets pléiotropes des sartans sont plus étayées. Il a été montré qu'ils exercent (i) un effet anti-oxydant par diminution de la production d'anion superoxyde au niveau vasculaire et protection mitochondriale (Iwai et al., 2008; Iwanami et al., 2010; Wakai et al., 2011) ; (ii) un effet anti-inflammatoire par diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β), de facteurs chimio-attractants (MCP-1), de molécules d'adhésion (P-sélectine, ICAM-1), de métalloprotéinases matricielles, et par réduction de l'activation microgliale et macrophagique (Hosomi et al., 2005; Iwanami et al., 2010; Kasahara et al., 2010; Kozak et al., 2009; Lou et al., 2004) ; (iii) des effets au niveau vasculaire, avec amélioration du débit sanguin cérébral dans la zone infarctée, remodelage vasculaire et angiogenèse (Forder et al., 2005; Kozak et al., 2009) . Il existe également des arguments expérimentaux suggérant un rôle anti-apoptotique (Lou et al., 2004) et promoteur de la neurogénèse (Krikov et al., 2008). Ces effets seraient en partie liés, pour certaines molécules comme l'irbésartan et le candésartan, à une activation du récepteur nucléaire PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ) (Schupp et al., 2004).

Ces effets pléiotropes sont à l'origine d'un effet neuroprotecteur bien établi au plan expérimental. De nombreuses études mettent en évidence un effet neuroprotecteur préventif des sartans, avec diminution du volume lésionnel et réduction du déficit neurologique associé. Ce bénéfice est retrouvé chez le rongeur soumis à occlusion permanente de l'ACM (Forder et al., 2005; Ito et al., 2002; Tsukuda et al., 2011) et transitoire (Engelhorn et al., 2004; Groth et al., 2003; Kasahara et al., 2010). L'initiation du traitement à la phase aiguë est bénéfique (Brdon et al., 2007; Hosomi et al., 2005), même avec un délai de 24 heures après induction de

l'ischémie (Engelhorn et al., 2004). Les effets neuroprotecteurs des sartans sont également retrouvés chez des animaux porteurs de facteurs de risque vasculaire : hypertension artérielle (Ito et al., 2002; Omura-Matsuoka et al., 2009), athérosclérose (Iwai et al., 2008) et diabète de type 2 (Iwanami et al., 2010).

Cette famille, comme les IEC, est également très largement utilisée chez l'Homme. L'introduction d'un sartan à la phase aiguë, dans les 30 heures suivant l'apparition des symptômes liés à l'AVC, ne semble pas associée à un bénéfice fonctionnel ou à une réduction de la mortalité à six mois (Sanset et al., 2011). Les données cliniques suggèrent par contre que le traitement par sartan en prévention secondaire diminuerait le risque de récurrence d'AVC (Schrader et al., 2005; Shiraishi et al., 2012). Ces données sont toutefois à considérer avec prudence, notamment les résultats de l'étude de Shiraishi et collaborateurs (2012) citée précédemment. En effet, suite aux soupçons portant sur les résultats expérimentaux et cliniques, basés sur la cohorte de la Kyoto Heart Study, du Professeur Matsubara, une note visant 5 études est parue dans le journal Hypertension (Cathcart, 2012). La Kyoto Heart Study est une étude randomisée et a été mise en place afin d'évaluer le bénéfice d'un traitement par valsartan chez le patient hypertendu à haut risque cardiovasculaire. La confirmation de la duplication et de la falsification de certaines données a abouti au retrait de ces 5 études, et également de l'étude parue en 2009 qui mettait en évidence une diminution du risque d'AVC chez les patients traités par valsartan, indépendamment de l'effet sur la pression artérielle (Sawada et al., 2009). Après élimination des falsifications, le bénéfice lié au traitement disparaît totalement.

3. Hypolipémiants

Nous nous intéresserons ici à deux classes d'hypolipémiants : les statines et les fibrates. Les statines sont des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (HydroxyMéthylGlutaryl Co-enzyme A réductase), enzyme responsable de la synthèse du mévalonate, étape limitante dans la synthèse du cholestérol. Le rôle des statines sera détaillé dans un paragraphe à part, cette famille de molécules étant la base de ce travail de thèse.

Les fibrates sont des agonistes du récepteur nucléaire PPAR α , facteur de transcription impliqué dans la régulation de nombreuses voies métaboliques, dont certaines intervenant dans le métabolisme lipidique. Il a été montré expérimentalement que les agonistes de PPAR α , fénofibrate, gemfibrozil et WY14643, exerçaient un effet neuroprotecteur en

traitement préventif. Cet effet neuroprotecteur était sous-tendu par (i) un effet anti-inflammatoire avec inactivation de NF κ B, diminution de l'expression de cytokines et enzymes pro-inflammatoires, des protéines d'adhésion et de l'activation microgliale, (ii) une action anti-oxydante avec diminution de la production d'espèces radicalaires et augmentation des enzymes anti-oxydantes (superoxyde-dismutase, catalase), et (iii) une amélioration du flux cérébral sans effet sur la NOS endothéliale. Pour une revue complète des effets de l'activation de PPAR α , nous renvoyons le lecteur à la revue de la littérature parue dans la revue *Current Drug Targets* (article en annexe).

Chez l'Homme, l'impact clinique d'un traitement par hypolipémiant, statine ou fibrate, avant survenue de l'AVC a été évalué sur une cohorte de 362 patients. Il apparaît que le traitement hypolipémiant préalable était indépendamment associé à une plus faible sévérité à l'admission (OR = 1,76 : IC à 95% [1,02 – 3,03]), et à un meilleur pronostic fonctionnel à 8 jours (Deplanque et al., 2006). Une méta-analyse récente reprenant 18 essais cliniques a confirmé l'effet bénéfique d'un traitement hypolipémiant par fibrate sur la réduction du risque cardiovasculaire (Jun et al., 2010). Toutefois, le traitement par fibrate ne semble pas associé à une réduction du risque d'accident vasculaire cérébral (Jun et al., 2010; Zhou et al., 2013).

B. Stratégies à la phase aiguë

Nous discuterons dans ce chapitre de trois médicaments très différents en termes de mode d'action pharmacologique, et qui n'ont à première vue pas de raison d'être utilisés en neurovasculaire. Toutefois, les données expérimentales encourageantes ont conduit à la mise en place de plusieurs études cliniques.

1. Minocycline

La minocycline est un antibiotique de la famille des tétracyclines, disponible en France depuis 1987. Elle est soumise à prescription hospitalière et réservée aux traitements des infections à germe sensible. Au-delà de ses propriétés antibiotiques, elle possède des effets pléiotropes intéressants dans le domaine neurovasculaire. Ils sont représentés par (i) une action anti-inflammatoire, avec diminution de l'activation microgliale, de la production de cytokines et d'enzymes pro-inflammatoires (IL-1 β , cyclo-oxygénase-2, NOS-2), et de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans la zone infarctée (Fan et al., 2013; Kim et al., 2009; Liu et al., 2007; Yrjänheikki et al., 1999); (ii) une action protectrice sur le compartiment vasculaire, avec diminution de la production et de l'activité des

métalloprotéases matricielles, de la fréquence des transformations hémorragiques spontanées, et préservation de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (Fan et al., 2013; Machado et al., 2009; Yenari et al., 2006) ; et (iii) une action anti-apoptotique (Chu et al., 2010; Machado et al., 2009). Deux des principales cibles de la minocycline semblent être la métalloprotéase matricielle-9 (MMP-9) (Koistinaho et al., 2005) et la poly-ADP-ribose polymérase-1 (PARP-1) (Li et McCullough, 2009), l'action neuroprotectrice de la minocycline n'étant plus présente chez les animaux KO pour ces deux cibles.

Les effets neuroprotecteurs d'un traitement par minocycline à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale ont été mis en évidence dans différents modèles expérimentaux, avec une diminution significative du volume lésionnel : ischémie cérébrale globale (Yrjänheikki et al., 1998) ; occlusion mécanique de l'artère cérébrale moyenne, transitoire (Liu et al., 2007; Machado et al., 2009; Xu et al., 2004; Yrjänheikki et al., 1999) ou permanente (Weng et Kriz, 2007) ; modèles thrombo-emboliques (Fan et al., 2013; Murata et al., 2008). Le traitement permet également, en parallèle, une amélioration de la récupération fonctionnelle, avec une réduction du déficit sensitivomoteur et des troubles cognitifs (Chu et al., 2010; Liu et al., 2007). La fenêtre thérapeutique semble large, le traitement par minocycline conserve un bénéfice lorsqu'il est initié jusqu'à 5 heures après occlusion transitoire de l'ACM (Xu et al., 2004). L'association de la minocycline au rtPA permet de majorer le bénéfice lié à une reperfusion précoce, tout en diminuant significativement le risque de transformation hémorragique secondaire chez le rat sauvage (Machado et al., 2009). Des résultats similaires sont retrouvés dans des modèles de facteurs de risque vasculaire : hypertension artérielle (Murata et al., 2008) et diabète (Fan et al., 2013). Cette combinaison permet d'administrer le rtPA jusqu'à 6 heures après occlusion artérielle tout en conservant un bénéfice significatif du traitement (Murata et al., 2008).

Une méta-analyse, réalisée sur les données expérimentales disponibles en 2010, mettait en évidence la qualité moyenne des études (O'Collins et al., 2011). Les auteurs soulignaient l'insuffisance de données, plus particulièrement l'insuffisance d'études menées sur des animaux porteurs de facteurs de risque vasculaire. Pourtant, à cette date, le passage en phase clinique de la minocycline est déjà effectué. Quelques années auparavant, une première étude en ouvert a en effet évalué le bénéfice d'un traitement par minocycline débuté à la phase aiguë (Lampl et al., 2007). Les 152 patients inclus étaient traités à la posologie classique de 200 mg/jour pendant 5 jours, la première dose étant administrée entre 6 et 24

heures après apparition des symptômes. Cette étude mettait en évidence une réduction significative du déficit neurologique à 3 mois dans le groupe minocycline. Une étude de phase I/II a ensuite été menée sur différentes doses de minocycline (3 à 10 mg/kg/jour) à la phase aiguë de l'AVC. La tolérance était satisfaisante, et l'association à l'altéplase ne semblait pas induire une augmentation du risque de complications hémorragiques (Fagan et al., 2010). Ces résultats encourageants ont donné lieu à la mise en place d'une étude de phase IV randomisée en double-aveugle contre placebo, l'étude NeuMAST (Neuroprotection With Minocycline Therapy for Acute Stroke Recovery Trial), la première dose de 200 mg était administrée entre 6 et 48 heures après le début des symptômes, puis une fois par jour pendant 5 jours. Cette étude s'est terminée en novembre 2012, les analyses intermédiaires ne mettant pas en évidence de réduction du déficit neurologique à 3 mois (Singh, 2012). Une étude randomisée évaluant un traitement intraveineux par minocycline débuté dans les 24 premières heures (100 mg/jour, 5 jours) ne retrouvait pas non plus de bénéfice à 3 mois (Kohler et al., 2013).

2. Facteurs de croissance

i. Erythropoïétine (EPO)

Il semblerait que l'EPO possède des propriétés ne se limitant pas à une action trophique sur la lignée érythrocytaire. Ces mécanismes annexes impliquent (i) une action anti-inflammatoire, avec diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires et de l'activation microgliale (Villa et al., 2003) ; (ii) une action anti-apoptotique (Bernaudin et al., 1999; Sirén et al., 2001) ; (iii) une induction de la neurogénèse, avec augmentation de l'expression du BDNF, du nombre et de la mobilisation des neuroblastes (Wang et al., 2004) ; et (iv) des effets pro-angiogéniques majeurs, avec augmentation de l'expression du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), de l'angiopoïétine-2 et de son récepteur Tie-2, formation de néovaisseaux et augmentation de la densité capillaire au pourtour du cœur de l'ischémie, et amélioration du débit sanguin cérébral (Li et al., 2007; Wang et al., 2004).

Dans les modèles animaux, le bénéfice est principalement lié à un effet promoteur de la neurogénèse et de l'angiogénèse. L'ischémie et le traitement par EPO induisent l'expression de récepteurs à l'EPO dans les trois compartiments de l'unité neuroglivasculaire (Bernaudin et al., 1999). L'effet neuroprotecteur de l'EPO a été caractérisé par une réduction du volume lésionnel et une amélioration de la récupération fonctionnelle, mis en évidence dans des modèles d'occlusion artérielle mécanique, le traitement étant débuté avant ou au

moment de l'occlusion (Li et al., 2007; Sirén et al., 2001; Villa et al., 2003), et dans des modèles d'occlusion artérielle thrombo-embolique avec initiation du traitement 24 heures après induction de l'ischémie (Wang et al., 2004; Zhang et al., 2010). La durée moyenne de traitement est de 7 jours. Une seule étude se base sur des animaux porteurs d'un facteur de risque vasculaire. Elle rapporte une diminution de la perte neuronale hippocampique associée à une moindre sévérité des troubles de mémoire spatiale chez le rat SHR traité par EPO après occlusion permanente de l'ACM (Sadamoto et al., 1998).

Cependant, ces résultats encourageants sont à nuancer. En effet, une méta-analyse récente souligne la qualité plutôt faible des études expérimentales évaluant le potentiel neuroprotecteur de l'EPO dans l'ischémie cérébrale. Les auteurs mettaient en évidence un lien entre qualité méthodologique et efficacité rapportée du traitement par EPO : plus la qualité des études est faible, plus le traitement semble efficace (Minnerup et al., 2009). Par ailleurs, l'association rtPA et EPO ne semble pas être sans risque. Cette association n'était pas associée à un sur-risque de transformation hémorragique 2 heures après occlusion artérielle embolique, ni d'ailleurs à un bénéfice supérieur en termes de volume lésionnel comparé au groupe rtPA seul. 6 heures après occlusion, l'impact était clairement délétère. Le volume lésionnel et la fréquence et la sévérité des hémorragies étaient augmentés par rapport au rtPA seul, tout comme l'expression de la MMP-9 (Jia et al., 2010). Des résultats similaires étaient retrouvés chez la souris, l'administration de rtPA et d'EPO immédiatement après levée de l'occlusion mécanique était associée à une augmentation de l'expression et de l'activité de la MMP-9 (Zechariah et al., 2010).

ii. Facteur de croissance granulocytaire (G-CSF)

Les effets bénéfiques du G-CSF dans l'ischémie cérébrale semblent dominés par une action stimulante sur la neurogenèse. Il a en effet été montré que les progéniteurs neuraux et les neurones matures expriment, après ischémie, le récepteur au G-CSF (Zhao et al., 2007a). A noter que les cellules gliales expriment également ce récepteur (Schabitz et al., 2003). Le traitement par G-CSF permet d'augmenter la mobilisation des cellules souches provenant de la moelle osseuse ainsi que la prolifération, la migration et la différenciation des progéniteurs en neurones matures (Kawada et al., 2006; Liu et al., 2010; Popa-Wagner et al., 2010; Sehara et al., 2007). Le traitement est également responsable d'un leucocytose, *a priori* sans conséquences chez l'animal (Schabitz et al., 2003).

Le traitement par G-CSF semble également moduler d'autres voies intervenant plus précocément dans la cascade physiopathologique de l'ischémie cérébrale : (i) excitotoxicité, avec diminution de la libération post-ischémique de glutamate (Han et al., 2008) ; (ii) inflammation, la production de cytokines et d'enzymes pro-inflammatoires (TNF α , NOS-2), et l'infiltration de cellules du système immunitaire, cellules dendritiques, monocytes, macrophages et lymphocytes T, dans le parenchyme lésé sont diminuées par un traitement aigu par G-CSF (Dietel et al., 2012; Komine-Kobayashi et al., 2005), l'action sur l'infiltration des polynucléaires neutrophiles semble par contre moindre, certains auteurs mettant même en évidence une augmentation de cette infiltration (Schabitz et al., 2003; Strecker et al., 2010) ; (iii) apoptose, avec modulation des voies pro- et anti-apoptotiques ayant pour conséquence une diminution de la mort cellulaire neuronale et astrocytaire (Komine-Kobayashi et al., 2005; Solaroglu et al., 2006) ; et (iv) angiogénèse, avec augmentation de l'expression de facteurs hématopoïétiques (angiopoïétine-2), de la densité microvasculaire et de la formation de néovaisseaux (Lee et al., 2005; Liu et al., 2010).

De nombreuses études rapportent un bénéfice marqué du traitement post-ischémique par G-CSF chez l'animal soumis à occlusion de l'artère cérébrale moyenne, principalement dans les protocoles d'occlusion transitoire. L'effet neuroprotecteur se traduit par une réduction du volume lésionnel, de l'atrophie cérébrale secondaire et en parallèle du déficit moteur et cognitif (Dietel et al., 2012; Gibson et al., 2005; Lee et al., 2005; Liu et al., 2010; Popa-Wagner et al., 2010; Sehara et al., 2007; Six et al., 2003; Solaroglu et al., 2006). Un tel bénéfice a également été mis en évidence chez le rat spontanément hypertendu (Zhao et al., 2007a) et chez le rat diabétique (Lan et al., 2008). Deux revues systématiques témoignent du potentiel neuroprotecteur du G-CSF après ischémie cérébrale (England et al., 2009; Minnerup et al., 2008). Les auteurs soulignent l'efficacité du G-CSF dans les modèles d'occlusion mécanique transitoire, le G-CSF semblant au contraire peu voire pas efficace en cas d'occlusion permanente. Les résultats des tests fonctionnels, bien qu'hétérogènes, vont dans le sens d'une amélioration significative du déficit neurologique. Du point de vue méthodologique, la qualité des études était moyenne à bonne, malgré la grande variabilité des doses testées, et la fenêtre thérapeutique large, de 4 à 24 heures après induction de l'ischémie. Les auteurs de ces deux études ne retrouvaient pas de corrélation entre la qualité des études et l'efficacité rapportée du traitement. Il est toutefois intéressant de noter que dans la revue de Minnerup et collaborateurs, deux des auteurs sont détenteurs du brevet concernant l'utilisation du G-CSF comme traitement neuroprotecteur.

Une fois encore, les résultats expérimentaux sont à considérer avec précaution. En effet, nous retrouvons dans la littérature des études, exclues des deux revues systématiques mentionnées ci-dessus, rapportant une absence d'effet (Bartolini et al., 2011; Kollmar et al., 2010; Matchett et al., 2007; Zhao et al., 2007b) voire un impact délétère du traitement par G-CSF (Taguchi et al., 2007). De plus, une seule étude (Kollmar et al., 2010) évaluait l'impact de l'association G-CSF et rtPA : l'administration de G-CSF et rtPA 1 heure après occlusion embolique de l'artère cérébrale moyenne n'était pas supérieure à l'administration de rtPA seul. L'administration séquentielle (G-CSF à 1 heure, rtPA à 3 heures) était associée à une majoration des lésions ischémiques et des transformations hémorragiques. L'impact d'une administration combinée à 3 heures n'était pas étudié. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude réalisée au laboratoire qui met en évidence un effet clairement délétère du G-CSF chez le rat soumis à occlusion transitoire de l'ACM et traité par rtPA et G-CSF.

iii. Données cliniques

Beaucoup d'espairs ont été et sont toujours fondés sur ces facteurs de croissance. La modulation de mécanismes physiopathologiques tardifs permettrait d'envisager une initiation du traitement un peu plus tardive. De plus, leur impact sur la neurogénèse et l'angiogénèse les positionne comme stratégies de neuroréparation. Ils pourraient ainsi représenter une nouvelle stratégie thérapeutique à la phase subaiguë. Malheureusement, les données cliniques dont nous disposons ne permettent pour le moment pas d'être aussi optimiste.

En effet, il n'y a à l'heure actuelle (juillet 2013) plus aucune étude clinique en cours évaluant l'une de ces deux molécules. Toutes deux ont fait l'objet d'études de phase III : pour l'EPO l'étude ESS (Multicenter Efficacy Study of Recombinant Human Erythropoietin in Acute Ischemic Stroke – Ehrenreich et al., 2009), et pour le G-CSF l'étude de phase II/III AXIS-2 (AX200 for the Treatment of Ischemic Stroke – Ringelstein et al., 2013), toutes deux négatives. Une méta-analyse récente a repris trois études portant sur l'EPO, dont l'étude ESS, et six études portant sur le G-CSF, dont l'étude AXIS-2 (Bath et al., 2013). Elle confirme qu'aucun bénéfice à trois mois n'est associé à un traitement par EPO ou G-CSF à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale. Le G-CSF ne présentait pas de problèmes de tolérance particuliers, alors que le risque de décès avant la fin du suivi était significativement augmenté chez les patients traités par EPO (OR=1,98 ; IC : [1,19 ; 3,30]) (Bath et al., 2013).

IV. Les statines : une stratégie pharmacologique intéressante ?

A. Propriétés pharmacologiques

1. Action princeps sur la synthèse du cholestérol

Cette classe est très largement utilisée en clinique pour ses propriétés hypolipémiantes. Les statines inhibent l'HMG-CoA réductase, qui catalyse la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate, précurseur du cholestérol. Cette étape est dite limitante. L'inhibition de la synthèse hépatique du cholestérol conduit *in fine* à la diminution du taux de LDL-cholestérol et à l'augmentation du taux de HDL-cholestérol plasmatiques. Les molécules de cette famille miment la moitié hydroxyméthylglutaryl de l'HMG-CoA. Elles diffèrent par leur potentiel inhibiteur de l'HMG-CoA réductase, représenté par la constante d'inhibition K_i , et par leur degré de lipophilie, donné par le logarithme du coefficient de partage octanol/eau logP (figure 11) (Arnaboldi et Corsini, 2010). La tolérance est plutôt bonne, les effets indésirables sont dose-dépendants et vont surtout concerner le muscle strié : douleurs musculaires, augmentation des créatine-phosphokinases, rarement rhabdomyolyse ; et le foie : augmentation modérée et asymptomatique des transaminases, plus rarement atteinte hépatique constituée.

2. Mécanismes sous-tendant les effets pléiotropes des statines

i. Mécanismes mévalonate-dépendants

Les effets pléiotropes des statines sont indépendants des effets liés à la baisse du cholestérol et sur l'athérome. Une partie de ces effets découle tout de même de l'inhibition de l'HMG-CoA réductase (figure 12). En effet, le mévalonate est un précurseur du cholestérol, mais également d'intermédiaires isoprénoïdes, dont le géranylgéranylpyrophosphate (géranylgéranyl-PP) et le farnésylpyrophosphate (farnésyl-PP). Ils interviennent dans les modifications post-traductionnelles de nombreuses protéines intervenant dans les processus de signalisation cellulaire : protéines G, protéines liant le GTP comme Ras et les protéines apparentées Rho et Rac (Adam et Laufs, 2008; Prinz et Endres, 2009). L'isoprénnylation de ces protéines permet leur ancrage à la membrane, leur passage sous forme active et leur transport intracellulaire. Sans cela elles s'accumulent dans le cytoplasme sous forme inactive. Les conséquences au final sont très larges, impactant la prolifération et la différenciation cellulaire, la coagulation et la production de radicaux libres.

Ce mécanisme intervient également dans une des voies majeures de l'effet neuroprotecteur des statines : l'impact sur la NOS endothéliale. La GTPase RhoA régule négativement la stabilité de l'ARN messager de la NOS endothéliale (Endres, 2005). L'inhibition de l'isoprénnylation de RhoA, qui reste donc sous forme inactive, permet un allongement de la demi-vie de ces ARN messagers.

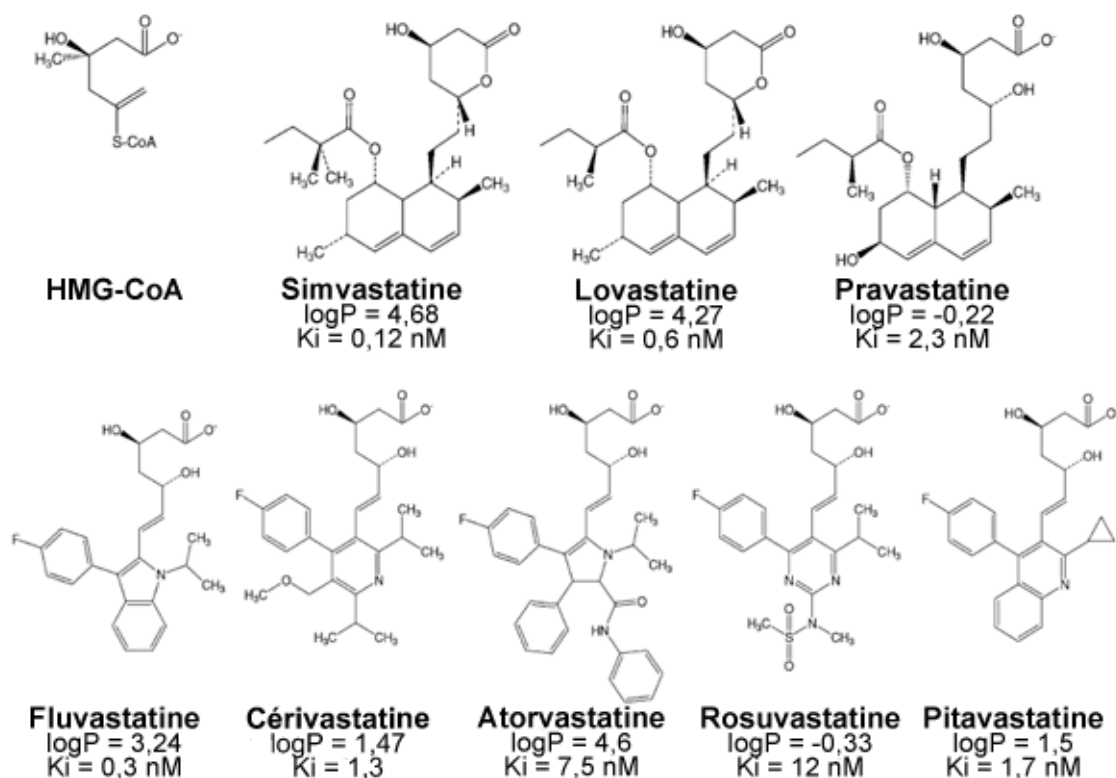


Figure 11: Les différentes statines. D'après Arnaboldi et Corsini, 2010.

ii. Mécanismes mévalonate-indépendants

a) Action sur la NOS endothéliale

Les statines vont également agir par d'autres mécanismes sur la NOS endothéliale, ne dépendant cette fois de la présence de mévalonate. Elles vont induire la synthèse de la tétrahydrobioptérine (BH₄), cofacteur majeur de la NOS endothéliale, et promouvoir certains signaux activateurs : phosphorylation activatrice par la voie PI3K/Akt, augmentation du recrutement de la protéine de choc thermique HSP90. Elles vont également agir de façon indirecte en augmentant la biodisponibilité du NO par inhibition de la NADPH-oxydase (Endres, 2005).

b) Action sur les effecteurs de l'inflammation

Les statines possèdent une action anti-inflammatoire, liée notamment à l'inhibition de l'activité des facteurs de transcription NFκB et AP-1. Cela entraîne l'inhibition en aval de l'expression de gènes de l'inflammation et de la cascade réactionnelle en résultant. Les mécanismes sous-jacents restent toutefois mal connus (Jasińska et al., 2007). Il a également été montré que les statines intervenaient sur l'infiltration leucocytaire parenchymateuse (figure 12). L'action est double : diminution de l'expression des protéines d'adhésion, et blocage de l'intégrine LFA-1 nécessaire à l'interaction avec ICAM-1 (Weitz-Schmidt et al., 2001).

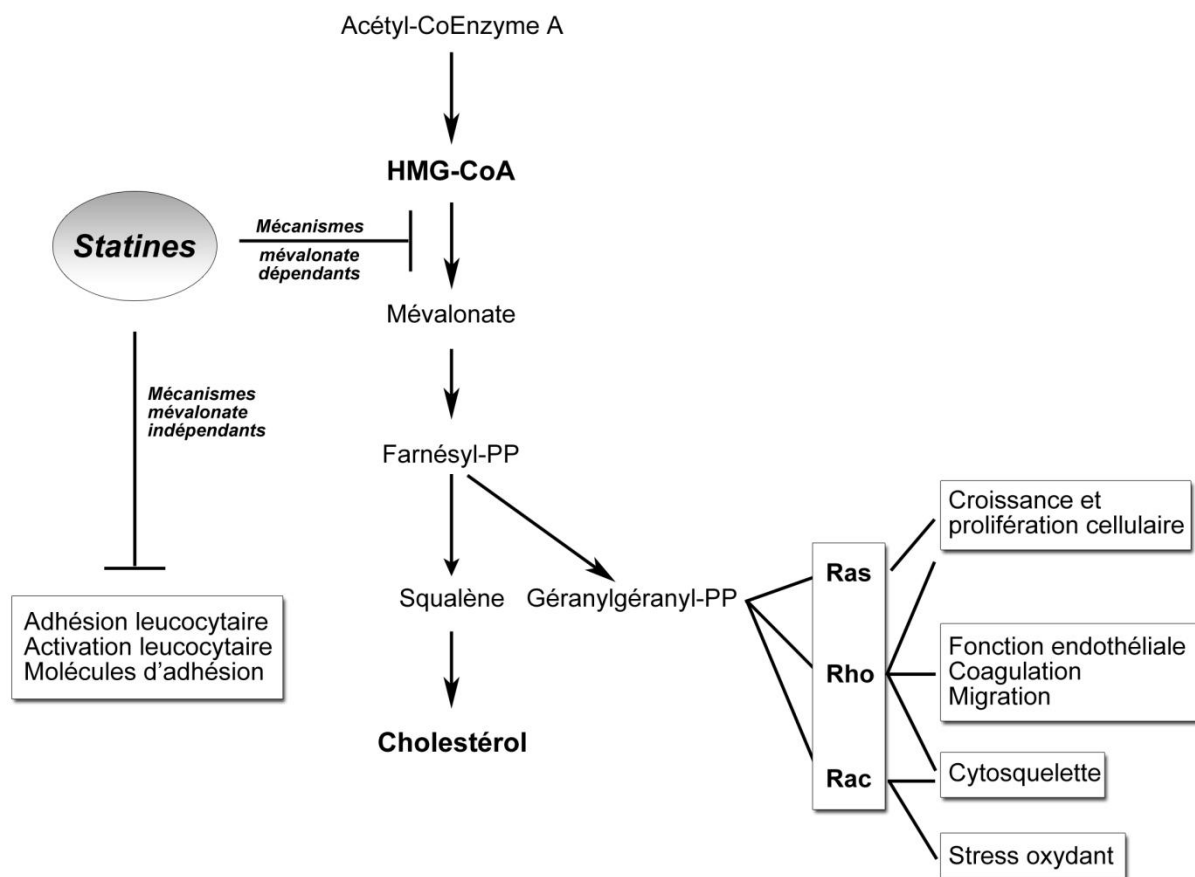


Figure 12 : Voie du mévalonate et effets pléiotropes des statines. Modifié d'après Prinz et Endres, 2009

c) Action sur les récepteurs PPAR

Il a par ailleurs été suggéré que les effets pléiotropes des statines soient, au moins en partie, liés à une activation indirecte des récepteurs nucléaires PPAR. Les PPAR sont des facteurs de transcription ligand-dépendants. Les statines ne sont pas des ligands pour ces

récepteurs, mais sont capables, *in vitro* d'augmenter l'activité transcriptionnelle de trois sous-types α , β/δ et γ (Inoue et al., 2002).

Les trois sous-types résultent de l'expression de trois gènes différents. Les ligands, les sites et niveaux d'expression diffèrent selon les sous-types. Les lipides et les produits du métabolisme lipidique en sont des ligands naturels. La fixation du ligand va entraîner l'activation et le changement de conformation du récepteur, rendant ainsi possible l'hétérodimérisation avec le Retinoid X Receptor (RXR) et la liaison à l'ADN au niveau de séquences de réponse spécifiques situées dans les régions promotrices de gènes cibles, appelées PPAR Response Elements ou PPRE, dont il va induire ou réprimer l'expression.

Les récepteurs PPAR α sont présents majoritairement dans les tissus où le catabolisme des acides gras et l'activité peroxysomale sont importants : foie, muscle cardiaque notamment. Ils interviennent dans la régulation du métabolisme lipidique et la biosynthèse des lipoprotéines. Le sous-type PPAR γ est quant à lui principalement retrouvé dans les adipocytes, où il joue un rôle dans la différenciation cellulaire et le stockage lipidique. Enfin, le troisième sous-type, PPAR β/δ , est le plus ubiquitaire. Son rôle n'est pas encore clairement élucidé, il semble jouer un rôle dans les mécanismes de réparation tissulaire et dans le métabolisme lipidique (Michalik et al., 2006; Qi et al., 2000).

Les PPAR sont exprimés dans les trois compartiments de l'unité neurogliovasculaire. Il existe des différences selon le territoire cérébral et le type cellulaire considérés (Moreno et al., 2004). Le sous-type majoritaire est PPAR β/δ , d'expression ubiquitaire. PPAR α est présent dans certaines régions bien définies, corticales, striatales et thalamiques. La présence de PPAR γ semble par contre plus restreinte et limitée aux ganglions de la base, à l'hippocampe, à l'hypothalamus et au cortex piriforme.

Il a été proposé que l'interaction avec PPAR α joue un rôle majeur dans les effets pléiotropes des statines, notamment dans l'effet anti-inflammatoire, et dans le bénéfice cardiovasculaire associé (Paumelle et Staels, 2008).

B. Impact physiopathologique d'un traitement par statine dans l'ischémie cérébrale

Les études précliniques ont permis de caractériser différentes cibles de l'effet neuroprotecteur des statines. Dans les modèles animaux, le traitement par statine était responsable d'une réduction du volume lésionnel et du déficit neurologique. Les effets pléiotropes mis en évidence comprenaient :

- une action anti-excitotoxique, mise en évidence *in vitro* sur culture de neurones primaires (Bösel et al., 2005) ;
- une action anti-oxydante (Hayashi et al., 2005; Kawai et al., 2011a) résultant principalement de l'inhibition de la NADPH-oxydase par diminution de l'expression de la sous-unité gp91 et de l'assemblage de l'enzyme à la membrane (Hong et al., 2006) ;
- une action anti-inflammatoire à tous les niveaux de la cascade de l'inflammation : diminution de l'activation de NFκB et de la production de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs chimio-attractants pour les leucocytes, diminution de l'adhésion leucocytaire (Mayanagi et al., 2008; Sironi et al., 2005, 2006), et diminution de l'activation microgliale (Lee et al., 2008) ;
- une action anti-thrombotique, par augmentation de la synthèse endogène de tPA et diminution de l'activation plaquettaire (Asahi et al., 2005; Gertz et al., 2003; Laufs et al., 2000a) ;
- une action anti-apoptotique (Zhang et al., 2011).

C. Traitement préventif par statine

1. Données expérimentales

La souche de rats SHR-SP a permis d'étudier l'effet des statines sur le risque de survenue d'AVC. Un traitement par cériavastatine 2 mg/kg/jour ou par atorvastatine 20 mg/kg/jour permettait de retarder la survenue du premier AVC et de prolonger significativement la survie, sans modifications des paramètres lipidiques (Kawashima et al., 2003; Tanaka et al., 2007b).

Les études évaluant l'impact d'un traitement préventif par statine ont été plutôt conçues pour mettre en évidence un effet neuroprotecteur précoc et identifier les mécanismes sous-jacents. Les animaux sont traités pendant 3 à 28 jours avant induction de l'ischémie cérébrale expérimentale, et la durée de suivi excède rarement 24 heures, ne permettant pas de mettre en évidence un effet à long terme du traitement. Toutes les statines ont été testées, à des posologies très variables mais souvent bien supérieures à celles utilisées chez l'homme. Pour exemple, pour la simvastatine, l'échelle de dose s'étend de 0,1 mg/kg/jour (Kim et al., 2008) à 100 mg/kg/jour (Shabanzadeh et al., 2005). L'effet neuroprotecteur d'un traitement préventif par statine a été mis en évidence chez différentes souches de souris et de rat ainsi que chez la gerbille, dans différents modèles : occlusion de l'artère cérébrale moyenne

transitoire (Endres et al., 1998; Hong et al., 2006) et permanente (Sironi et al., 2006), modèle thrombo-embolique (Asahi et al., 2005; Shabanzadeh et al., 2005) et modèle d'ischémie cérébrale globale (Himeda et al., 2005).

2. Données cliniques

i. Prévention primaire

La première étude de grande envergure à avoir mis en évidence une réduction de la mortalité d'origine cardiovasculaire liée au traitement par statine est l'étude 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study). Cette étude de prévention secondaire portait sur 4 444 patients suivis pendant 5,4 ans (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, 1994). L'incidence des accidents vasculaires cérébraux était également diminuée dans le groupe traité. Depuis, l'impact d'un traitement par statines sur le risque d'AVC en prévention primaire et secondaire a fait l'objet de nombreuses études cliniques, mettant globalement en évidence une réduction du risque d'AVC chez les patients traités. La réduction du risque a été confirmée par une méta-analyse en 2009. En prévention primaire, le risque relatif global d'AVC est évalué à 0,81 (intervalle de confiance à 95% : [0,75 – 0,85]) ; et en prévention secondaire à 0,82 (IC à 95% [0,77 – 0,87]) (Amarenco et Labreuche, 2009).

ii. Prévention secondaire

L'étude SPARCL (Stroke Prevention by Aggressive Cholesterol Lowering) a permis de mettre en évidence l'intérêt des statines en prévention secondaire. Elle a été mise en place pour étudier spécifiquement le risque de récurrence d'AVC après un premier AVC ou AIT (Amarenco et al., 2006). Les patients étaient traités par atorvastatine 80 mg/jour ou placebo, le traitement était débuté 1 à 6 mois après le premier AVC ou AIT. A la fin de la période de suivi de 5 ans, le groupe atorvastatine présentait une réduction significative du risque de deuxième AVC et d'évènement cardiovasculaire mortel on non. Le risque d'AVC ischémique était diminué (HR = 0,78 ; IC à 95% [0,66 – 0,94]). Par contre, le risque d'AVC hémorragique était majoré (HR = 1,66 ; IC à 95% [1,08 – 2,55]). La tolérance au traitement était satisfaisante.

iii. Impact sur la sévérité et le pronostic fonctionnel

Un traitement par statine avant survenue d'un premier AVC, en prévention primaire, est associé à une diminution de la mortalité lors de l'hospitalisation (OR = 0,57 ; IC à 95%

[0,36 – 0,89]) (Arboix et al., 2010). Ces résultats ont été confirmés par la méta-analyse de Lakhan et collaborateurs (Lakhan et al., 2010). Le traitement préalable par statine est également associé à un meilleur pronostic fonctionnel (OR = 1,62 ; IC à 95% [1,39 – 1,88]) (Biffi et al., 2011).

Une analyse secondaire de l'étude SPARCL, menée sur la population de patients inclus ayant présenté un deuxième AVC ne met pas en évidence de différence sur la sévérité initiale. En cas d'AVC ischémique, un traitement préalable par atorvastatine semble améliorer, de manière non significative, la récupération fonctionnelle à 3 mois. Aucun effet du traitement n'est détecté chez les patients ayant présenté un AVC hémorragique (Goldstein et al., 2009).

D. Traitement par statine à la phase aiguë

1. Données expérimentales

Seules certaines statines ont été testées à la phase aiguë : pravastatine, atorvastatine, simvastatine et rosuvastatine, dans des modèles d'occlusion mécanique (transitoire et permanente) et thrombo-embolique de l'ACM. Deux schémas posologiques ont été étudiés. Dans le premier cas, le traitement est initié au moment de l'induction de l'ischémie ou aux alentours de la reperfusion, pour une durée moyenne de 72 à 96 heures. Dans ce schéma de traitement, une réduction du volume lésionnel ainsi qu'une diminution du déficit neurologique étaient mises en évidence. Cet effet neuroprotecteur était associé à une diminution de l'expression des marqueurs de l'inflammation (Berger et al., 2008b; Wang et al., 2010; Zhang et al., 2005) et de l'activation microgliale (Céspedes-Rubio et al., 2010). L'induction de la NOS endothéliale était également décrite (Prinz et al., 2008). Dans le deuxième schéma posologique, la première administration du traitement est retardée de 24 à 48 heures par rapport à l'induction de l'ischémie. Le traitement est poursuivi pour 7 à 14 jours. Le traitement n'impactait plus le volume lésionnel. L'effet sur la récupération fonctionnelle était conservé. Il était accompagné d'une majoration des phénomènes d'angiogénèse, de neurogénèse et de synaptogénèse, avec augmentation de la libération de facteurs de croissance (VEGF, BDNF) et de la prolifération, de la migration et de la différenciation des progéniteurs (Chen et al., 2003, 2005). L'induction de ces mécanismes de plasticité était également retrouvée chez le rat âgé (Chen et al., 2006).

2. Données cliniques

Les données cliniques sur le bénéfice éventuel de l'introduction d'un traitement par statine à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale restent très limitées. Si un traitement par statine avant survenue d'un AVC est associé à une diminution de la mortalité à un an (HR = 0,85 ; IC à 95% [0,79 – 0,93]), la poursuite du traitement durant l'hospitalisation diminue de façon plus importante le risque de décès (HR = 0,59 ; IC à 95% [0,53 – 0,65]). L'arrêt du traitement le majore au contraire (HR = 2,50 ; IC à 95% [2,10 – 2,90]) (Flint et al., 2012a). L'initiation précoce du traitement lors de l'hospitalisation permet de réduire le risque d'évènement cardiovasculaire à 6 mois, dont le risque d'AVC (HR = 0,66 ; IC à 95% [0,57 – 0,77]) (Yeh et al., 2010).

E. Bilan des études précliniques

Les données concernant l'évaluation préclinique des statines dans l'ischémie cérébrale expérimentale sont rassemblées dans les tableaux suivants. Le tableau 3 reprend les données en traitement préventif, et le tableau 4 les données en traitement aigu.

Tableau 3 : Traitement préventif par statine et neuroprotection dans l'ischémie cérébrale expérimentale – données précliniques.

Molécules testées	Souches et modèles	Dose et voie d'administration	Effets	Références
Lovastatine	tMCAO (souris	0,2 – 20 mg/kg/j SC	↓volume d'infarctus	Endres et al., 1998
Simvastatine	SV129, souris C57BL/6J sauvages – KO NOS-3)	3 et 14 jours	↑DSC, ↑NOS-3 Pas d'effet protecteur chez KO NOS-3	
Atorvastatine	tMCAO (souris SV129 sauvages – KO NOS-3)	0,5 – 1 – 10 mg/kg/j SC 14 jours	↓volume d'infarctus ↑NOS-3 ↓PAF-4, β-TG	Laufs et al., 2000a
Simvastatine	tMCAO (souris SV129 sauvages – KO NOS-3)	20 mg/kg/j SC 14 jours	↓volume d'infarctus ↑NOS-3 ↓activité Rho	Laufs et al., 2000b
Mévastatine	tMCAO (souris SV129 et KO NOS-3)	SC en continu 2 mg/kg/j 20 mg/kg/j 7 – 14 – 28 jours	↓ volume d'infarctus ↓ déficit neurologique ↑ NOS-3 (ARNm et protéine)	Amin-Hanjani et al., 2001

Rosuvastatine	tMCAO (souris SV129)	0,2 – 2 – 20 mg/kg/j SC 10 jours	↓volume d'infarctus ↑NOS-3	Laufs et al., 2002
Atorvastatine	tMCAO (souris SV129)	10 mg/kg/j SC 14 jours	↓volume d'infarctus ↑NOS-3 ↓β-TG, PAF-4 2 et 4 j d'arrêt avant tMCAO : plus d'effet sur volume d'infarctus, ↓NOS-3	Gertz et al., 2003
Cérivastatine	Rats SHR-SP	2 mg/kg/j PO 28 jours	↓incidence infarctus et mortalité ↓volume des lésions ↑NOS-3 ↓production $O_2^{\bullet-}$ ↓infiltration leucocytaire	Kawashima et al., 2003
Simvastatine	pMCAO (rats Sprague-Dawley)	20 mg/kg SC 48h, 24h, 2h avant O	↓volume lésionnel ↑NOS-3	Sironi et al., 2003
Pravastatine	Ischémie cérébrale globale (rats Wistar)	20 mg/kg/j PO 14 jours	↓mort neuronale hippocampique	Daimon et al., 2004
Pitavastatine	tCCAO (gerbilles)	6 – 20 – 60 mg/kg/j PO 5 jours	↓perte neuronale hippocampique ↑Cu/Zn-SOD	Kumagai et al., 2004
Simvastatine Atorvastatine	tMCAO et modèle TE (souris SV129, souris C57BL/6J sauvages – KO NOS-3 – KO tPA)	20 mg/kg/j SC 14 jours	Souris sauvages : ↑ NOS-3, ↑ tPA Pas d'effet sur PAI-1 KO NOS-3 : pas de protection dans modèle TE KO tPA : pas de protection dans modèle tMCAO	Asahi et al., 2005
Atorvastatine Pitavastatine Simvastatine	tMCAO (rats Wistar)	AT et Sim : 20 mg/kg/j PO Pita : 10 mg/kg/j PO 14 jours	↓volume d'infarctus ↓HNE, 8-OHdG Pas d'effet de l'AT	Hayashi et al., 2005
Pitavastatine	tCCAO (gerbilles)	6 – 20 – 60 mg/kg/j PO 5 jours	↓perte neuronale hippocampique	Himeda et al., 2005

Atorvastatine Pitavastatine Simvastatine	Rats SHR-SP	AT20 : 20 mg/kg/j Pita : 10 mg/kg/j Sim : 20 mg/kg/j PO 28 jours	↓volume lésionnel (AT et Sim) ↓4-HNE, 8-OHdG, HEL (Sim)	Nagotani et al., 2005
Simvastatine	Modèle TE (rats Sprague-Dawley)	100 mg/kg/j 14 jours	↓volume d'infarctus ↓œdème ↑reperfusion ↓déficit neurologique	Shabanzadeh et al., 2005
Rosuvastatine	tMCAO (rats Sprague-Dawley)	5 mg/kg/j SC 7 j prétraitement et 7 j post-traitement	↓volume d'infarctus Pas d'effet sur déficit neurologique	Engelhorn et al., 2006
Atorvastatine	tMCAO (rats Sprague-Dawley)	10 mg/kg SC 48h, 24h, 2h avant IR	↓volume d'infarctus ↓production $O_2^{\bullet-}$ ↓assemblage et activité NADPH oxydase	Hong et al., 2006
Simvastatine	pMCAO (rats Sprague-Dawley)	20 mg/kg SC 48h, 24h, 2h avant O	↓MCP-1, IL-1 β ↓activation NF κ B, ERK1/2	Sironi et al., 2006
Pravastatine	tMCAO (rats Wistar)	20 mg/kg/j PO 4 semaines	↓volume d'infarctus ↓déficit neurologique ↓perte collagène IV ↓extravasation Hb	Trinkl et al., 2006
Simvastatine	tMCAO (souris Swiss diabétiques)	1 mg/kg/j IP 14 jours	↓ volume d'infarctus ↓ déficit neurologique	Çakmak et al., 2007
Pitavastatine	tCCAO (gerbilles)	6 – 20 – 60 mg/kg/j PO 5 jours	↓perte neuronale hippocampique ↓HSP70 ↑ubiquitine ↑BDNF, NGF	Himeda et al., 2007
Atorvastatine	Rats SHR-SP	2 – 20 mg/kg/j PO 11 semaines	↑survie sans AVC ↑survie après AVC ↓incidence AVC ↓ADMA	Tanaka et al., 2007b
Simvastatine	tMCAO (souris C57BL/6J sauvages – KO NOS-3)	0,1 – 1 – 10 – 20 mg/kg/j IP 14 jours	↓volume lésionnel ↑DSC ↑relaxation endothélium dépendante ↑activité NOS-3	Kim et al., 2008

Atorvastatine	tMCAO (rats Sprague-Dawley)	1 mg/kg/j PO 10 jours	↓volume d'infarctus ↓déficit neurologique ↓Ox42, iNOS	Lee et al., 2008
Rosuvastatine	tMCAO (souris C57BL/6J obèses)	10 mg/kg/j IP 3 jours	↓volume d'infarctus ↓ICAM-1	Mayanagi et al., 2008
Rosuvastatine	Rats SHR-SP	10 mg/kg/j PO	↑survie sans AVC ↓MCP-1, IL-1 β , TGF β ↑NOS-3 ↑relaxation endothélium dépendante	Gelosa et al., 2010
Atorvastatine	tMCAO (rats Zucker)	10 mg/kg/j PO 28 jours	↓volume d'infarctus ↓8-OHdG, 4-HNE, AGE ↓MCP-1, TNF α	Kawai et al., 2011a
Atorvastatine	tMCAO (rats Zucker)	10 mg/kg/j PO 28 jours	↓MMP-9 ↑collagène IV ↓Rc AT-1	Kawai et al., 2011b
Atorvastatine	tMCAO (rats Zucker)	10 mg/kg/j PO 4 semaines	↓volume d'infarctus ↓apoptose ↓autophagie	Zhang et al., 2011

ADMA : Diméthyl arginine asymétrique ; AGE : produits de glycation avancée ; DSC : Débit sanguin cérébral ; HEL : Hexanonyl-Lysine ; HNE : Hydroxy-Nonéal ; 8-OHdG : 8-Hydroxy déoxy-Guanosine ; PAI-1 : Inhibiteur de l'Activateur tissulaire du Plasminogène-1 ; pMCAO : occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne ; tCCAO : occlusion transitoire des artères carotides communes ; tMCAO : occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne.

Tableau 4 : Traitement aigu par statine et neuroprotection dans l'ischémie cérébrale expérimentale – données précliniques.

Molécules testées	Souches et modèle	Dose et voie d'administration	Effets	Références
Simvastatine	pMCAO (souris SV129 mâles et femelles)	2 mg/kg/j SC 14 jours	↑DSC	Yamada et al., 2000
Atorvastatine Simvastatine	tMCAO (rats Wistar)	AT : 1 – 3 – 8 mg/kg/j PO Sim : 1 mg/kg/j PO 24h après O, 7 jours	Pas d'effet sur volume d'infarctus et de dose AT8 ↑récupération fonctionnelle ↑angiogénèse, prolif. endothéliale ↑VEGF, GMPc, Akt/PI3K ↑synaptophysine	Chen et al., 2003
Atorvastatine Simvastatine	pMCAO (rats Sprague-Dawley)	AT : 10 mg/kg Sim : 0,2 – 2 - 20 mg/kg SC 3h et 25h après O	↓volume lésionnel, effet dose (Sim) ↑NOS-3	Sironi et al., 2003
Atorvastatine	Rats SHR-SP	3 – 30 mg/kg/j PO	↑survie ↓déficit neurologique ↑NO plasmatique	Hayashi et al., 2004
Atorvastatine	pMCAO (souris C57BL/6J)	10 mg/kg/j SC 24h après O, 7 et 14 jours	Pas d'effet sur volume d'infarctus ↑récupération fonctionnelle ↑VEGF, VEGFR2, BDNF ↑ neurogénèse, plasticité synaptique, angiogénèse	Chen et al., 2005
Rosuvastatine	tMCAO (souris C57BL/6J)	0,5 – 5 – 20 mg/kg IP à la reperfusion	↓volume lésionnel ↓ERK1/2 ↓caspase-3, iNOS	Kilic et al., 2005b
Simvastatine	pMCAO (rats Sprague-Dawley)	20 mg/kg SC 1 dose 1h après O	Pas d'effet sur NFκB, ERK1/2	Sironi et al., 2006
Atorvastatine	pMCAO (rats Wistar âgés)	3 mg/kg/j PO 24h après O, 7 jours	Pas d'effet sur volume d'infarctus ↑production neuroblastes à 28 jours	Chen et al., 2007

Pravastatine	tMCAO (rats Wistar)	50 mg/kg/j SC en continu 48h après IR, 6 jours	↓ volume d'infarctus ↑ récupération motrice Pas d'effet sur prolifération progéniteurs neuraux	Sugiura et al., 2007
Pravastatine	tMCAO (rats Wistar)	0,1 – 0,5 – 1 – 2 mg/kg IP 30 min – 6h – 1, 2, 3 et 4 jours après O	↓ volume d'infarctus ↓ glutamate ↓ IL-6 ↑ DSC	Berger et al., 2008b
Rosuvastatine	tMCAO (souris SV129)	0,02 – 0,2 – 2 mg/kg IV 0,2 – 2 – 20 mg/kg IP Dose unique 1 à 6h après O	↓ volume d'infarctus Fenêtre thérapeutique : 4h ↑ récupération fonctionnelle ↑ NOS-3, pNOS-3, pAkt	Prinz et al., 2008
Simvastatine	tMCAO (rats Wistar)	1 mg/kg/j PO 24h après R, 7 jours	↑ densité et calibre artérioles ↑ prolifération CML vasculaires ↑ PS1, Notch	Zacharek et al., 2009
Atorvastatine	tMCAO (rats Wistar)	10 mg/kg PO 6h après R puis 1/j pendant 3 jours	↓ volume d'infarctus ↓ déficit neurologique ↓ activation microgliale ↑ plasticité synaptique	Céspedes-Rubio et al., 2010
Atorvastatine	pMCAO (rats Sprague-Dawley)	5 – 20 mg/kg IP 1 dose après O	↓ volume d'infarctus et œdème ↓ déficit neurologique ↓ LOX, p38MAPK, PLA2 ↑ claudine-5 ↓ perméabilité BHE	Cui et al., 2010
Simvastatine	tMCAO (rats Wistar)	1 mg/kg/j PO 24h après O, 14 jours	Pas d'effet sur volume d'infarctus ↓ déficit neurologique	Shehadah et al., 2010
Atorvastatine	pMCAO (rats Sprague-Dawley)	5 – 20 mg/kg IP 1 dose après O	↓ volume d'infarctus ↓ œdème ↓ NFκB, HMGB1, RAGE, TLR4	Wang et al., 2010

Pravastatine	pMCAO (rats SHR)	0,1 – 0,3 – 1 – 3 mg/kg IV 10 minutes après O	Pas d'effet sur volume d'infarctus, activation astrocytaire et apoptose ↓œdème ↑NOS-3	Mariucci et al., 2011
Atorvastatine	pMCAO (rats Sprague-Dawley)	10 mg/kg/j IP 1 ^{ère} dose après O 1 et 3 jours	Pas d'effet sur le volume d'infarctus, sur peroxirédoxine et Nrf2 ↓ œdème	Du et al., 2012

DSC : Débit sanguin cérébral ; LOX : Lipo-oxygénase ; PLA2 : PhosphoLipase A2 ; pMCAO : occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne ; PS1 : Préséniline 1 ; RAGE : Récepteur pour les produits de glycation avancée ; TLR4 : Récepteur Toll-Like 4 ; tMCAO : occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne

PRESENTATION DU TRAVAIL

Les statines représentent une approche pharmacologique intéressante, car exerçant des effets pléiotropes leur conférant un large spectre d'action. Dans ce travail, nous avons cherché à caractériser l'effet neuroprotecteur de l'atorvastatine au plan fonctionnel, à mettre en évidence les effets pléiotropes sur l'unité neurogliovasculaire au plan cellulaire, et à confirmer l'importance du récepteur nucléaire PPAR α dans cet effet neuroprotecteur au plan moléculaire.

Nous avons étudié l'effet neuroprotecteur d'un traitement post-ischémique par atorvastatine pendant 72 heures après ischémie-reperfusion. Cet effet neuroprotecteur est objectivé par une diminution du volume lésionnel et du volume d'œdème chez les animaux traités. L'impact tissulaire est associé à une meilleure récupération fonctionnelle au niveau moteur, mise en évidence par un déficit neurologique moindre, et une meilleure récupération de la force musculaire et de la sensibilité chez les animaux traités. La mortalité tendait également à diminuer.

Nous nous sommes intéressés à l'effet du traitement post-ischémique par atorvastatine sur le compartiment vasculaire. Le traitement par atorvastatine confère une protection vasculaire à plusieurs niveaux. La fonction endothéliale, évaluée par la capacité de relaxation et la sensibilité à l'acétylcholine, est protégée. La densité microvasculaire est augmentée chez les animaux traités, et l'intégrité de ces vaisseaux semble préservée. Enfin, l'atorvastatine limite les interactions entre leucocytes et endothélium, l'expression de la protéine d'adhésion ICAM-1 et l'infiltration des polynucléaires neutrophiles sont réduites dans le parenchyme ischémié (article n°2, en préparation).

Par ailleurs, nous avons évalué le rôle du récepteur nucléaire PPAR α dans l'effet neuroprotecteur préventif et aigu de l'atorvastatine. Nous avons pour cela soumis à ischémie-reperfusion cérébrale et traité par atorvastatine des souris chez qui le gène codant pour PPAR α a été invalidé. La réduction du volume lésionnel constatée chez les animaux de phénotype sauvage disparaît chez les animaux KO en traitement préventif et en traitement aigu. Le récepteur PPAR α apparaît nécessaire à la réduction de l'expression des protéines d'adhésion ICAM-1 et VCAM, et à l'induction de l'expression de la NOS endothéliale par l'atorvastatine en traitement préventif (article n°1).

MATERIEL ET METHODES

I. Protocoles

A. Etude de l'effet neuro- et vasculoprotecteur aigu de l'atorvastatine

Des souris sauvages mâles de souche C57BL/6J, pesant entre 28 et 32 grammes (CERJ, France), ont été utilisées. Les animaux sont logés dans des armoires ventilées, en environnement à température contrôlée et en cycle jour/nuit de 10h/14h. Ils ont accès à l'eau et à la nourriture ad libitum.

Les animaux étaient suivis selon deux protocoles : un **protocole court (durée de suivi 24 heures, figure 13)** et un **protocole long (durée de suivi 72 heures, figure 14)** après ischémie-reperfusion. Pour chaque protocole, les animaux étaient randomisés aléatoirement après une heure d'ischémie cérébrale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne droite et recevaient par gavage, immédiatement puis 5 heures après, de l'atorvastatine à la dose de 10 ou 20 mg/kg/jour ou du véhicule seul (0,05% carboxyméthylcellulose, 0,02% tween, eau).

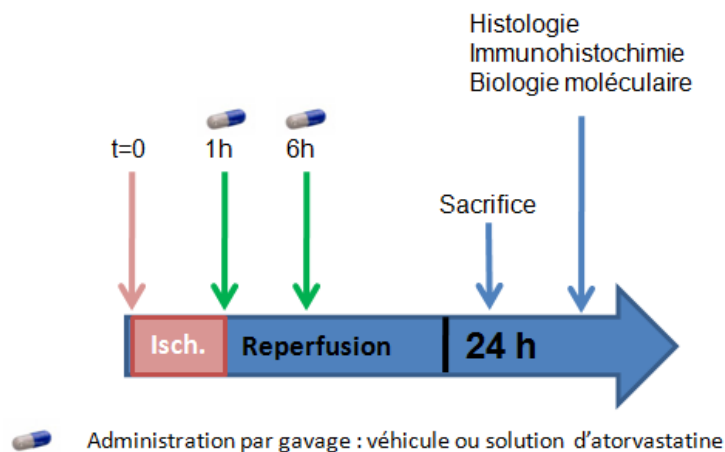


Figure 13 : Traitement aigu par atorvastatine – protocole court.

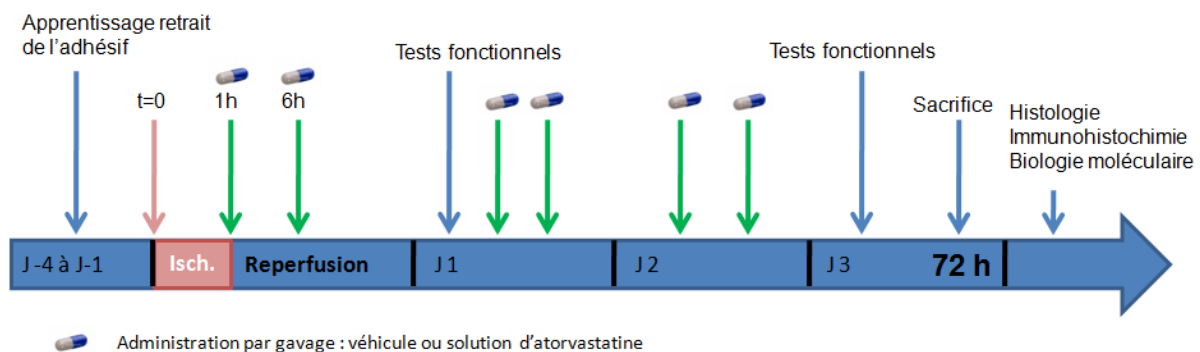


Figure 14 : Traitement aigu par atorvastatine – protocole long.

Les animaux du protocole court étaient sacrifiés à 24 heures de reperfusion.

Dans le cadre du protocole long, les animaux étaient suivis pendant 72 heures et recevaient deux administrations quotidiennes d'atorvastatine ou de véhicule. L'évaluation de la récupération fonctionnelle était réalisée à 24, 48 et 72 heures de reperfusion, avant la première administration de la journée et avant le sacrifice pour la dernière évaluation.

L'artère cérébrale moyenne droite était prélevée avant congélation pour étude de la fonction endothéliale.

Les cerveaux étaient prélevés:

- pour permettre l'estimation des volumes d'infarctus par histomorphométrie et l'étude immunohistochimique de marqueurs vasculaires ;
- pour permettre les analyses de biologie moléculaire.

B. Etude de l'implication du récepteur PPAR α dans l'effet neuro- et vasculoprotecteur de l'atorvastatine

Des souris mâles de fond génétique C57BL/6J n'exprimant pas le récepteur PPAR α et pesant entre 28 et 32 grammes ont été utilisées pour cette étude. Ces souris ont été obtenues par une collaboration avec l'unité INSERM U1011 et résultent d'au moins six croisements. Elles avaient les mêmes caractéristiques que les animaux sauvages : sexe, poids, âge, et étaient hébergées et nourries dans les mêmes conditions.

Le traitement était administré selon deux modalités. Le premier protocole consistait en un traitement chronique de 14 jours avant ischémie-reperfusion. Les animaux étaient traités par atorvastatine par voie sous-cutanée à la dose de 10 mg/kg/jour (2 injections par jour), ou par véhicule seul (éthanol absolu 5%, PBS à pH=7,4). Ils étaient ensuite soumis à ischémie-reperfusion par occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne droite et sacrifiés 24 heures après (figure 15).

Les cerveaux étaient prélevés:

- pour permettre l'estimation des volumes d'infarctus par histomorphométrie ;
- pour permettre les analyses en biologie moléculaire (western-blot et PCR).

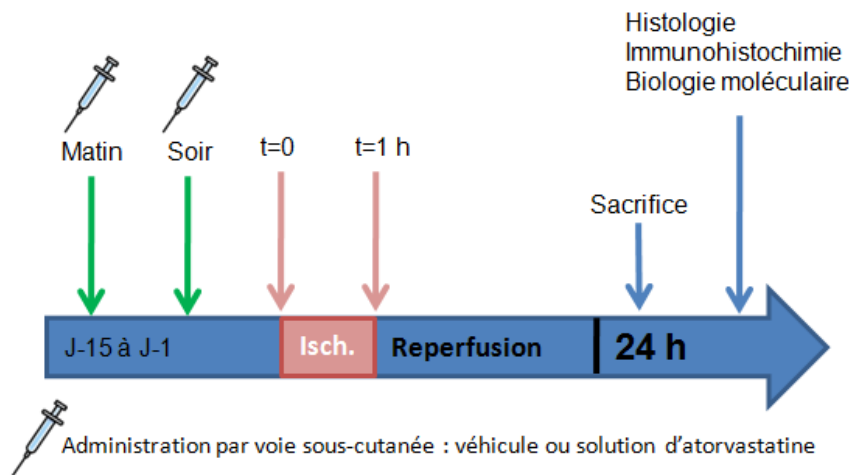


Figure 15 : Protocole d'étude de l'implication du récepteur PPAR α – traitement préventif par atorvastatine.

Le deuxième protocole reposait sur l'administration post-ischémique d'atorvastatine, les animaux étaient traités pendant 72 heures par atorvastatine 10 mg/kg/jour ou véhicule seul (deux injections sous-cutanées par jour). La première injection avait lieu à la reperfusion, la seconde 5 heures plus tard (figure 16). Les cerveaux étaient prélevés pour permettre l'estimation des volumes d'infarctus par histomorphométrie.

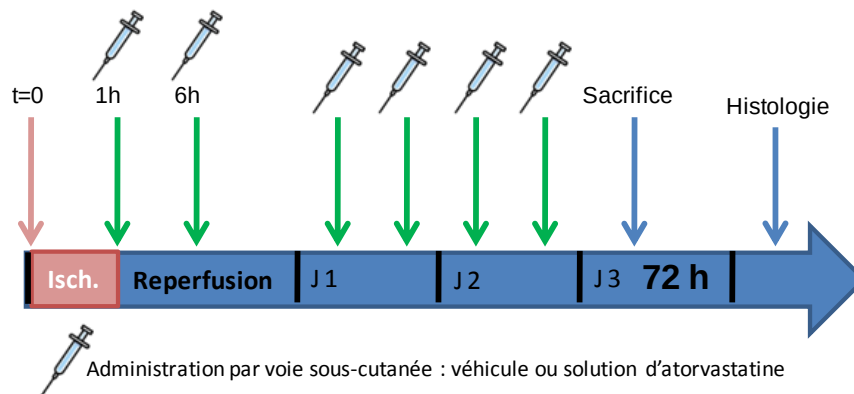


Figure 16 : Protocole d'étude de l'implication du récepteur PPAR α – traitement post-ischémique par atorvastatine.

C. Critères d'inclusion et d'exclusion

1. Critères d'inclusion

- Lésion ischémique correspondant au territoire de l'artère cérébrale moyenne droite, objectivée par la coloration au crésyl violet.

2. Critères d'exclusion

- Lésion ischémique ne correspondant pas au territoire de l'artère cérébrale moyenne droite, objectivée par la coloration au crésyl violet
- Hémorragie massive
- Décès avant la fin de la période de suivi
- Non validation de l'apprentissage pour le test du retrait de l'adhésif (exclusion de l'animal pour la partie « tests fonctionnels »).
- Pour l'étude de réactivité vasculaire :
 - coagulation intraluminale lors du montage de l'artère
 - non réponse à la phényléphrine ou au SNP.

II. Méthodes

A. Modèle d'ischémie cérébrale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne

Après anesthésie à l'hydrate de chloral par voie intrapéritonéale (300 mg/kg, Sigma-Aldrich, France), une incision cervicale médiane est réalisée, et l'artère carotide primitive, la bifurcation carotidienne et la base des artères carotide interne et externe sont exposées. Le nerf vague est dégagé. Une ligature est posée à la base de l'artère carotide primitive et sur l'artère carotide externe, à proximité de la bifurcation carotidienne. Une troisième ligature est posée, mais non serrée, sur la carotide primitive qui est clampée. Une artériotomie est réalisée, par laquelle est insérée un fil de nylon chirurgical de calibre 6/0, dont l'extrémité a préalablement été émoussée à la flamme. Le fil est monté doucement jusqu'à buter contre le clamp. La troisième ligature est alors serrée, le clamp retiré, et le fil d'occlusion poussé très progressivement dans l'artère carotide primitive puis dans la carotide interne. Une légère résistance à la poussée indique que le fil est en place au niveau de l'ostium de l'artère cérébrale moyenne, interrompant de fait le flux sanguin au niveau de cette artère (figure 17).

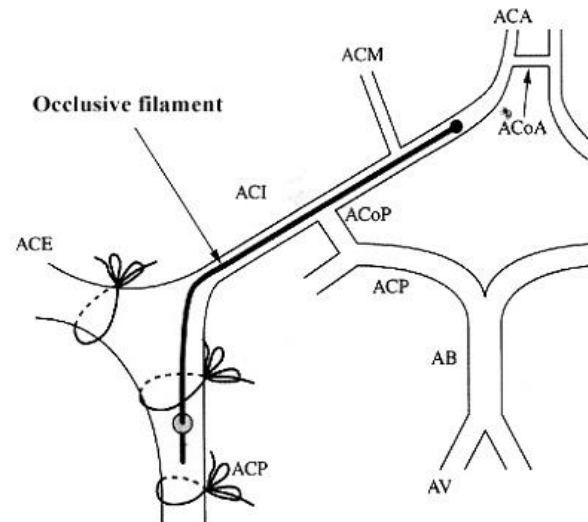


Figure 17 : Modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale par occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne. ACI : Artère carotide interne, ACE : artère carotide externe, ACP artère carotide primitive, ACM : artère cérébrale moyenne, AV artère vertébrale, AB : artère basilaire, ACP : artère cérébrale postérieure, ACoP : artère communicante postérieure, ACA : artère cérébrale antérieure, ACoA : artère communicante antérieure.

B. Evaluation fonctionnelle

L'objectif était d'évaluer le type d'atteintes fonctionnelles occasionnées chez l'animal par la réalisation de l'ischémie cérébrale. Cette évaluation permettait également d'objectiver une éventuelle récupération après modulation pharmacologique. Elle était réalisée chez les animaux suivis pendant 72 heures après ischémie/reperfusion (protocole long, figure 14) et comprend quatre tests. Les animaux décédant avant 72 heures étaient exclus de l'étude.

Le **score neurologique** (d'après Bederson et al., 1986) permet une évaluation rapide de l'état général de l'animal. Il comprend 5 niveaux : 0 = pas de déficit neurologique ; 1 = défaut d'extension de la patte avant gauche et/ou flexion du haut du corps vers le côté gauche quand l'animal est tenu par la queue ; 2 = lorsqu'il est tenu par la queue les pattes au sol et/ou de manière spontanée, l'animal se déplace en cercles vers la gauche ; 3 = au repos, l'animal est allongé sur le côté gauche et/ou il chute du côté gauche lorsqu'il se déplace ; 4 = pas d'activité locomotrice spontanée.

Le **grip test** (figure 18) permet une évaluation simple de la force musculaire au niveau de la moitié supérieure du corps. Tenu par la queue, les pattes arrière dans le vide, l'animal est mis à agripper une grille reliée à un boîtier électronique (Bioseb, France) permettant ainsi de mesurer la force de traction exercée par l'animal.



Figure 18 : Souris saine soumise au grip test.

Le **test de la barre** (figure 19) permet à la fois d'évaluer la dextérité et la force musculaire des animaux. L'animal testé est mis à agripper, au-dessus d'un matelas de mousse, un fil métallique (diamètre = 0,1 cm ; longueur = 50 cm ; hauteur = 40 cm) par les pattes avant uniquement. Le temps de maintien sur le fil est chronométré, dans la limite de 60 secondes.



Figure 19 : Souris saine soumise au test de la barre.

Le **test du retrait de l'adhésif** (figure 20 – adapté d'après Bouet et al., 2009) permet l'évaluation de la dextérité, de la motricité fine et de la sensibilité des animaux. Il consiste en l'application, sur la paume des pattes avant, de morceaux de bande adhésive (3M, Royaume-Uni) de dimensions déterminées (0,40 cm de côté). Quatre jours d'apprentissage, réalisés avant la chirurgie, sont nécessaires. A chaque session, chaque animal est testé 5 fois et l'ordre d'apposition des morceaux d'adhésif (patte droite ou patte gauche en premier) est alterné.

Lors de la dernière session, la technique est considérée comme apprise par l'animal s'il retire les deux morceaux d'adhésif en moins de 10 secondes. Le cas échéant, il est exclu de l'évaluation fonctionnelle post-ischémie. Après chirurgie, les animaux sont testés deux fois par session (un essai où le morceau d'adhésif de la patte droite est posé en premier, un essai où le morceau d'adhésif de la patte gauche est posé en premier). Les délais de détection des morceaux d'adhésif (lorsque l'animal secoue les pattes et/ou les porte à la bouche) et de retrait pour chacune des deux pattes sont mesurés, dans une limite de 120 secondes.



Figure 20 : Souris saine soumise au test du retrait de l'adhésif.

C. Euthanasie et préparation des tissus

A la fin des protocoles, les animaux sont tous euthanasiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital (300 mg/kg, Ceva Santé animale, France).

1. Etude de la réactivité vasculaire

Avant la congélation du cerveau prélevé par immersion dans de l'isopentane à -25°C pendant 60 minutes, l'ACM droite est prélevée délicatement selon un protocole précis (cf. paragraphe D. 1). Le cerveau est ensuite coupé au cryostat et les coupes colorées au crésyl violet pour confirmation visuelle de la présence d'une lésion. Aucune quantification de volume n'est faite sur ces tissus non fixés.

2. Etude histologique

Les animaux sont perfusés par voie intracardiaque avec du sérum physiologique hépariné froid, puis avec du paraformaldéhyde 4% (Diapath, Italie). Le cerveau est ensuite prélevé, et une post-fixation est réalisée par immersion de 4 heures dans du

paraformaldéhyde. Elle est suivie d'une déshydratation dans du sucrose à 20% et à 30% pour cryoprotection (12 heures pour chaque étape, Sigma-Aldrich, France). Les cerveaux sont enfin plongés 40 minutes dans de l'isopentane, puis conservés à -30°C. Des coupes de 14 µm d'épaisseur sont réalisées à -25°C dans un cryostat (CM 3050 S, Leica, Allemagne). 12 niveaux stéréotaxiques de coupes sont prélevés pour l'analyse histomorphométrique ultérieure (Paxinos et Franklin, 2001). Plusieurs coupes du sixième stade (stade commissure, bregma + 0,14 mm) sont prélevées pour la réalisation des marquages immunohistochimiques. Ces coupes sont ensuite conservées à -80°C.

3. Analyse génique et protéique

Les animaux sont brièvement perfusés par voie intracardiaque avec du sérum physiologique hépariné froid et placés immédiatement sur un pain de glace. Le cerveau et l'aorte sont prélevés. L'aorte est immédiatement congelée par immersion dans de l'azote liquide. Le cerveau est disséqué dans un bain de PBS froid : le cervelet est retiré, les hémisphères séparés, le cortex et le striatum de chaque hémisphère sont disséqués et immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Les échantillons sont conservés à -80°C.

D. Réactivité vasculaire ex-vivo

Cette technique permet de mettre en évidence les altérations vasculaires fonctionnelles secondaires à l'ischémie-reperfusion, notamment au niveau endothélial, par étude de la réponse d'un vaisseau isolé à différents stimuli pharmacologiques. Cela permet également d'évaluer l'impact d'une modulation pharmacologique. L'étude de la réactivité vasculaire était réalisée en aveugle du groupe de traitement, l'expérimentateur n'était informé que du statut « sham » ou « ischémié » de l'animal testé.

1. Préparation de l'artère : prélèvement, canulation et stabilisation

Le cerveau est placé dans une solution saline physiologique ([NaCl] = 119 mM, [NaHCO₃] = 24 mM ; [KCl] = 4,7 mM ; [KH₂PO₄] = 1,18 mM ; [MgSO₄, 7 H₂O] = 1,17 mM ; [glucose] = 10 mM ; [CaCl₂] = 1,6 mM ; pH = 7,40) oxygénée par un mélange de gaz (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂) et refroidie. L'artère cérébrale moyenne droite est délicatement et rapidement prélevée, puis placée dans la cuve de perfusion d'un artériographe d'Halpern (modèle CH/2/A, Living System Instrumentation, Etats-Unis).

L'ACM est ensuite montée entre les deux canules de verre de diamètre 50 μm et maintenue en place par deux ligatures (Bai et al., 2004). Un léger écoulement de solution saline par la canule proximale permet l'élimination du sang restant dans l'artère au moment du montage. La canule proximale est reliée à un capteur de pression, lui-même connecté à un contrôleur de flux, constitué d'une micropompe péristaltique (P270, Instech, Etats-Unis) et d'une interface de contrôle de pression (Pressure Servo Control, Living System Instrumentation, Etats-Unis) (figure 21). La canule distale est fermée, ce qui permettra l'analyse en l'absence de flux. Le système maintient la pression intraluminale constante. La solution saline physiologique circule également en continu dans la cuve de l'artériographe via un second circuit. Le tout est placé dans le champ d'un microscope à focale inversée connecté à un système d'acquisition vidéo, ce qui permettra l'enregistrement des variations de diamètre intraluminal du segment d'artère. Si du sang a coagulé dans l'artère, l'expérimentation est stoppée. La solution saline physiologique est portée progressivement à 37°C, l'artère est stabilisée à une pression intraluminale de 20 mm Hg pendant une heure.

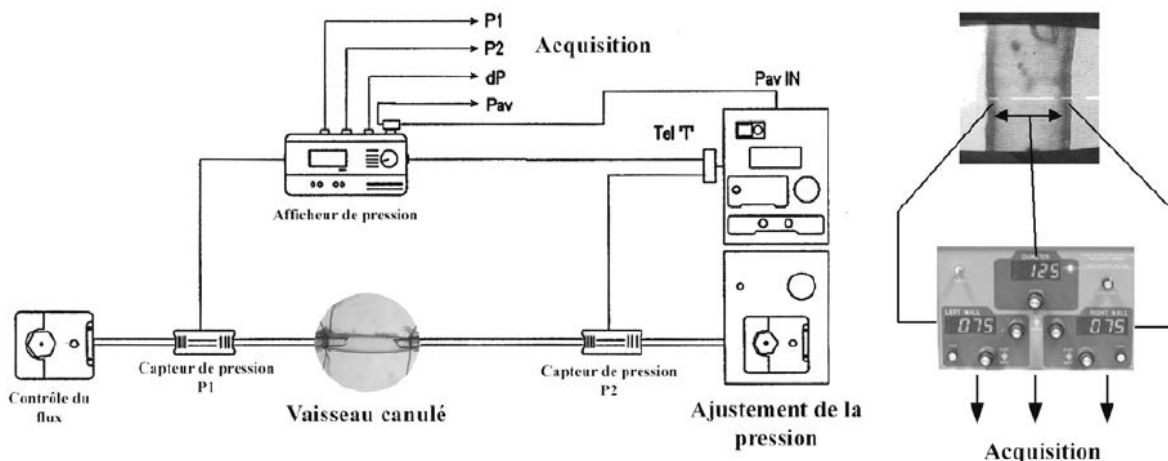


Figure 21 : Principe de fonctionnement d'un artériographe d'Halpern.

2. Etude de la relaxation endothélium-dépendante

L'ensemble du protocole est représenté figure 22. Après précontraction par ajout dans la cuve de l'artériographe de phényléphrine, ou Phe, (Sigma-Aldrich, France), un agent sympathomimétique (10^{-4} M), l'artère est soumise à des concentrations croissantes de carbamoylcholine, ou CCh (Sigma-Aldrich, France), un analogue de l'acétylcholine, à des concentrations croissantes (10^{-9} M à 10^{-4} M), qui va induire une relaxation endothélium-dépendante. L'effet de la carbamoylcholine sur le vaisseau est exprimé en fonction de

l'augmentation de diamètre, après précontraction à la phényléphrine, en réponse aux concentrations croissantes appliquées, ce résultat est présenté sous forme d'une courbe concentration-réponse.

La réponse de l'artère est exprimée en pourcentage d'augmentation du diamètre ($\emptyset$) et calculée par la formule suivante : **% réponse = $[(\emptyset_{CCh} / \emptyset_{Phe}) - 1] \times 100$**

Le pourcentage d'augmentation maximale du diamètre induite par la carbamoylcholine était calculé par la formule suivante :

$$\text{\% réponse} = [(\emptyset_{CCh} - \emptyset_{Phe}) / (\emptyset_{\text{repos}} - \emptyset_{Phe})] \times 100$$

Les données sont également présentées sous forme d'un pourcentage de l'effet maximal, afin de déterminer la concentration permettant d'obtenir 50 % de l'effet maximal, la CE50. Un calcul informatique était réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software, Etats-Unis) afin d'affiner le calcul de la CE50 en appliquant une modélisation mathématique sigmoïde.

3. Relaxation endothélium-indépendante et implication du NO

Afin d'étudier de façon indirecte la part jouée par la production endothéliale de NO dans la relaxation à la carbamoylcholine, un antagoniste compétitif de la NOS endothéliale, la N^ω-Nitro-L-Arginine ou L-NNA (Sigma-Aldrich, France), est utilisé. L'artère est mise en présence de L-NNA à la concentration de 10⁻⁴ M pendant 10 minutes. Du nitroprussiate de sodium, ou SNP (Sigma-Aldrich, France), est ensuite ajouté à la concentration de 10⁻⁴ M. Le SNP est un donneur de NO qui induit une vasodilatation endothélium-indépendante, permettant également de vérifier la viabilité des cellules musculaires lisses.

Ce protocole permettait, en s'affranchissant de l'action de la NOS endothéliale, de mesurer la relaxation ne dépendant pas du NO, et donc indirectement la relaxation liée au NO.

Le pourcentage d'augmentation de diamètre induit par le SNP était calculé par la formule suivante : **% réponse = $[(\emptyset_{SNP} - \emptyset_{Phe}) / (\emptyset_{\text{repos}} - \emptyset_{Phe})] \times 100$**

Le pourcentage d'augmentation du diamètre lié à la libération endothéliale de NO était calculé ainsi : **% réponse = $[(\emptyset_{L-NNA} - \emptyset_{Phe}) / (\emptyset_{CCh \text{ maximal}} - \emptyset_{Phe})] \times 100$**

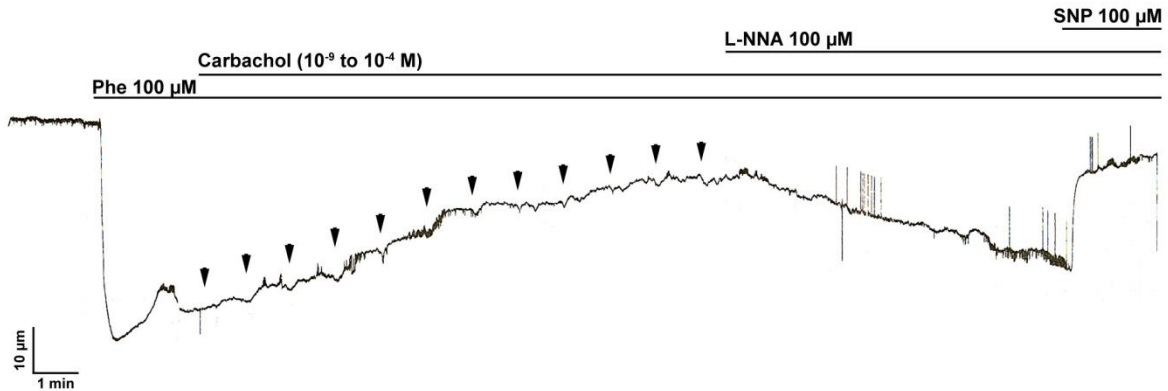


Figure 22 : Protocole de réactivité vasculaire – exemple de tracé obtenu pour un animal du groupe IR+AT20 à 72 heures de reperfusion. Carbachol = carbamoylcholine.

Les artères ne répondant pas à la phényléphrine ou au SNP sont exclues des analyses ultérieures, et apparaissent dans les tableaux de répartition des effectifs dans la première partie des résultats sous la mention « non exploitable ».

E. Histomorphométrie

Après post-fixation dans un bain de FAM (Formaldéhyde 10 %, Acide Acétique glacial 10 %, Méthanol 80 %), les coupes de cerveau sur lames sont rincées à l'eau désionisée puis plongées dans une solution de crésyl violet à 50 mg/mL (Sigma-Aldrich, France) pendant 10 minutes. Elles sont ensuite déshydratées et décolorées par passage dans des bains d'éthanol de titre croissant, la coloration est fixée dans deux bains successifs de Neo-Clear® (Merck, France). Enfin, les lames sont séchées et montées avec lamelles (milieu de montage DPX, CellPath, Royaume-Uni).

Les coupes ainsi colorées sont numérisées pour quantification du volume d'infarctus. Les cellules mortes ne prenant pas la coloration, la zone infarctée apparaît plus claire (figure 23). L'aire de la zone infarctée est mesurée sur les 12 niveaux de coupe à l'aide du logiciel Image J (NIH, Etats-Unis), en aveugle du groupe de traitement. Une estimation du volume infarcté est calculée par intégration des surfaces ainsi mesurées. Pour s'affranchir de l'effet de l'œdème, le volume calculé est corrigé par la formule suivante (Bordet et al., 2000) : volume de l'infarctus corrigé = volume de l'infarctus mesuré x (volume de hémisphère sain / volume de hémisphère ischémié).

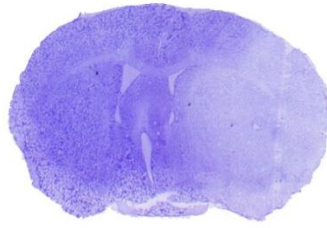


Figure 23 : Exemple de coloration au crésyl violet – animal du groupe IR+Veh à 24 heures de reperfusion.

F. Analyse immunohistochimique des marqueurs vasculaires

1. Révélation colorimétrique

Deux marquages sont réalisés par cette méthode : le marquage d'ICAM-1 et de la myéloperoxydase. ICAM-1 est une protéine d'adhésion pour les leucocytes, exprimée par les cellules endothéliales après ischémie notamment sous l'influence de stimuli pro-inflammatoires. La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme spécifique des polynucléaires neutrophiles, stockée dans des granules intracytoplasmiques.

Après inhibition des peroxydases endogènes à l'aide d'un mélange H_2O_2 à 30 volumes – méthanol – PBS, une étape de blocage des sites d'interactions non spécifiques est réalisée par incubation des lames dans du sérum de chèvre à 10% (Vector, Etats-Unis). Les coupes sont ensuite rincées et l'anticorps primaire est déposé. L'incubation dure 12 heures à $+4^\circ C$. Après rinçage, les lames sont mises en contact avec l'anticorps secondaire dilué au 1/500. L'incubation dure 3 heures à température ambiante. L'anticorps secondaire est couplé à un complexe avidine-peroxydase (Vectastain ABC kit, Vector, Etats-Unis), puis l'activité enzymatique est révélée par réaction avec le complexe diaminobenzidine/ H_2O_2 . Les étapes suivantes de déshydratation et de montage des lames sont similaires aux étapes terminales d'histomorphométrie.

2. Immunofluorescence

Le marquage du collagène de type IV est réalisé par cette technique. Le collagène de type IV est un constituant majeur de la lame basale des vaisseaux sanguins cérébraux.

La première étape consiste en une perméabilisation membranaire et un blocage des sites d'interactions non spécifiques. Pour cela, les coupes sont mises en contact pendant une heure avec une solution de tampon KPBS contenant 10% de sérum de cheval (Vector, Etats-Unis) et 0,2% de Triton-X100 (Sigma-Aldrich, France). Après rinçages, les anticorps

primaires (tableau 5) sont déposés, après dilution dans une solution de KPBS contenant 0,2% de Triton-X100. Les lames sont mises à incuber 12 heures à +4°C. Elles sont ensuite mises en contact avec les anticorps secondaires pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Enfin, les lames sont montées avec lamelles et protégées avec du Vectashield DAPI (Vector, Etats-Unis).

Tableau 5 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en immunohistochimie.

Cible	Espèce productrice	Dilution	Fournisseur	Référence
<i>Anticorps primaires</i>				
Collagène de type IV	Lapin	1/200	Abcam	Ab19808
ICAM-1	Lapin	1/200	Proteintech	10020-1-AP
Myéloperoxydase	Lapin	1/500	DAKO	A0398
<i>Anticorps secondaires</i>				
Alexa Fluor donkey anti-rabbit 488	Ane	1/500	Invitrogen	A21206

3. Analyse semi-quantitative

Toutes les lames étaient anonymisées avant lecture ou acquisition des images. La levée de l'aveugle n'avait lieu qu'après lecture de la totalité des lames et finalisation de la quantification.

i. Méthode colorimétrique

Les lames sont lues au microscope, au grossissement 100. Pour le comptage des cellules positives pour la MPO et le comptage des vaisseaux marqués pour ICAM-1, une lecture quantitative des lames est réalisée sur quatre champs déterminés de 1 mm² au niveau de la zone d'ischémie (figure 24).

ii. Fluorescence

Les lames sont lues au microscope confocal (LSM 710, Zeiss, France) à l'objectif 20 x et aux longueurs d'onde correspondant aux anticorps secondaires utilisés. L'acquisition est réalisée grâce au logiciel ZEN 2010 (Zeiss, France). Le paramétrage est strictement identique pour toutes les acquisitions : puissance du laser 8,00, gain 739, digital offset -11, digital gain 1,0, profondeur 16 bits, moyennage 4, vitesse de balayage 7, résolution 512x512. Une

mosaïque associée à un z-stack est réalisée. L'image obtenue correspond à une surface de 2125,48 μm de long sur 1700,38 μm de large, soit une surface de 3,61 mm^2 (figure 24). Les images sont ensuite post-traitées pour obtenir la projection MIP (Maximum Intensity Projection).

La coupe est ensuite reconstituée à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, Etats-Unis), convertie à partir du format LSM (format image constructeur Zeiss) en image au format tiff encodée au format RVB (Rouge – Vert – Bleu). Le canal correspondant au vert est extrait, et l'image est convertie en 256 niveaux de gris. Le niveau de gris moyen, correspondant à l'intensité moyenne de fluorescence, est mesuré. L'aire moyenne occupée par le marquage est mesurée sur les images MIP converties également en niveaux de gris par la même méthode, en conservant le même seuillage pour chaque mesure (seuil fixé à 25).

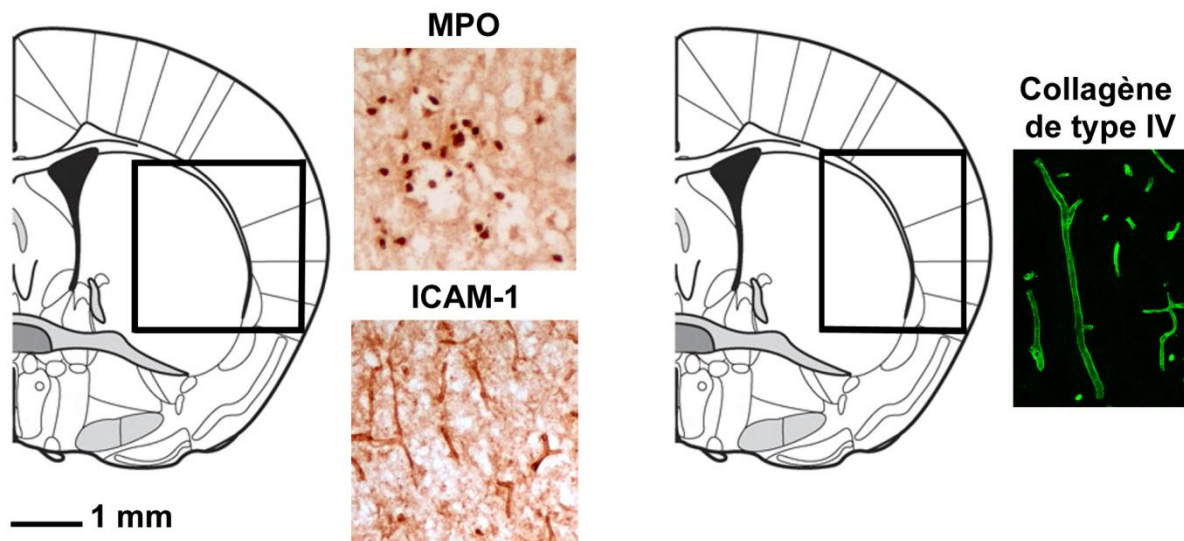


Figure 24: Zones de quantification des marquages immunohistochimiques.

G. Analyse de l'expression génique de la NOS endothéliale par rt-PCR

1. Purification et dosage des acides ribonucléiques

Les échantillons sont conservés sur glace. Chaque échantillon (cortex, striatum ou aorte) est mis en suspension dans 300 μL de tampon d'extraction Extract-All (Eurobio, France) et broyé à l'Ultra-Turrax (modèle T10 basic, Ika, Allemagne). Pour séparer les ARN des autres constituants cellulaires, 60 μL de chloroforme (Sigma-Aldrich, France) sont ajoutés. Les tubes sont ensuite centrifugés 15 minutes à $+4^{\circ}\text{C}$ à 15 000 RPM. La phase supérieure est récupérée, à laquelle sont ajoutés 150 μL d'isopropanol (Sigma-Aldrich, France). Après centrifugation à 15 000 RPM $+4^{\circ}\text{C}$ pendant 30 minutes, le surnageant est

éliminé et les culots sont lavés avec 500 μL d'éthanol à 70°, et centrifugés de nouveau pendant 10 minutes à +4°C et 15 000 RPM. La phase alcoolique est éliminée et les culots sont laissés à l'air libre pour que les dernières traces d'éthanol s'évaporent. Les culots sont ensuite resolubilisés dans 50 μL d'eau ultrapure et dosés au Nanodrop (Labtech, France), par lecture de la densité optique à 260 et 280 nm.

2. Synthèse des ADN complémentaires

Les échantillons sont tout d'abord soumis à l'action de la DNase, qui va éliminer les traces d'ADN résiduel risquant d'interférer avec la suite du protocole. A 2 μg d'ARN brut est ajouté le mélange réactionnel contenant 1 μL de DNase (Roche, France) et 3 μL de tampon de l'enzyme (Roche, France), pour un volume final de 30 μL . Le mélange est ensuite incubé 40 minutes à 37°C et 25 minutes à 75°C (inactivation de l'enzyme).

1 μg d'ARN DNasé est ensuite soumis à rétrotranscription. Le mélange réactionnel comprend dans un volume final de 25 μL : 0,5 μL d'enzyme Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Etats-Unis), 5 μL de tampon de l'enzyme (Invitrogen, Etats-Unis), 1 μL d'amorces hexanucléotidiques (Invitrogen, Etats-Unis), 1 μL d'oligodT (Invitrogen, Etats-Unis) et 1 μL de nucléotides (dNTP) (Invitrogen, Etats-Unis). Le mélange est ensuite incubé dans les conditions suivantes : 10 minutes à 24°C (étape d'hybridation des amorces), 40 minutes à 50°C (étape d'élongation) et 15 minutes à 75°C (inactivation). Le volume final est ensuite porté à 100 μL par ajout d'eau ultrapure, et les échantillons sont conservés à -80°C.

3. PCR quantitative

Cette méthode permet la quantification en temps réel de l'ADN répliqué, par la mesure du nombre d'amplicons. Des sondes fluorescentes vont se fixer sur l'ADN double brin, le signal résultant sera lu en temps réel. Une fois le seuil de fluorescence atteint, correspondant à la quantité minimale d'amplicons nécessaire pour dépasser ce seuil de détection, le nombre de cycles correspondants (crossing point) est relevé. Il permet de calculer la quantité d'ADN initiale.

Une première amplification est effectuée sur le gène de référence, la TBP (TATA Box Binding Protein), pour vérifier la bonne qualité des ADN complémentaires. La deuxième amplification est effectuée sur le gène de la NOS endothéliale (tableau 6). Le mélange réactionnel comprend 20 ng d'ADN complémentaire, 4,2 μL d'eau ultrapure (Eurobio,

France), 0,6 µL d'enzyme (Bioline, France), 2 µL de tampon de l'enzyme (Bioline, France), 0,2 µL de SYBR Green (Roche, France), 0,5 µL d'amorce sens et 0,5 µL d'amorce anti-sens (solutions à 3 µM, TBI Molbiol, France).

Il est déposé dans des capillaires (capillaires Light Cycler, Roche, France). Les capillaires sont centrifugés avant réalisation de la PCR dans un thermocycleur LightCycler (Roche, France). L'incubation se fait dans les conditions suivantes : 8 minutes à 95°C puis 40 cycles selon le schéma suivant : 10 secondes à 95°C (dénaturation), 10 secondes à 60°C (hybridation), 10 secondes à 72°C (élongation). Une courbe de fusion est réalisée en fin d'incubation pour vérifier la spécificité des produits amplifiés.

Tableau 6 : Séquence des amorces utilisées pour l'analyse génique.

Gène étudié	Séquence des amorces
TATA-Box Binding Protein (TBP)	Sens 5'-GGCGGTTTGGCTAGGTTT-3' Anti-sens 5'-GGGTTATCTTCACACACCATGA-3'
NO-synthase endothéliale	Sens 5'-ATCCAGTGCCCTGCTTCA-3' Anti-sens 5'-GCAGGGCAAGTTAGGATCAG-3'

L'amplitude de variation d'expression de la NOS endothéliale, ou fold change, est calculée par rapport au groupe véhicule, après normalisation sur le niveau d'expression génique de la TBP.

H. Analyse de l'expression protéique d'ICAM-1 et VCAM par western-blot

1. Extraction et dosage des protéines

Une solution de tampon RIPA (Tris, HCl 50 mM ; déoxycholate de sodium 6 mM, NaCl 150 mM ; Igepal Ca-630 1% ; EGTA 1 mM ; pH=7,40) contenant 10% d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, France) est préparée. La solution est ajoutée aux échantillons : 500 µL par cortex, 300 µL par striatum. Ils sont ensuite broyés à l'ultraturax, laissés à reposer sur glace 30 minutes, puis centrifugés 30 minutes à +4°C et 13 000 g. Le surnageant est récupéré.

Le dosage est réalisé à l'aide du kit DC Protein Assay kit II (Biorad, France). Ce kit permet le dosage colorimétrique de protéines selon la méthode de Lowry, en plaques 96 puits. Les échantillons sont dilués au 1/40^{ème}. Une gamme d'étalonnage d'albumine bovine est réalisée en parallèle, comprenant 10 points de concentration croissante de 0 à 1 mg/mL.

Chaque point est doublé, la concentration finale retenue étant la moyenne des deux mesures. La lecture est faite sur lecteur de microplaque à 690 nm.

2. Migration et séparation

Des broyats de cerveaux de souris ayant reçu une injection de lipopolysaccharide (1,5 mg/kg, Sigma-Aldrich, France) 24 heures avant sacrifice sont utilisés comme témoin positif. Le témoin de masse utilisé couvre une gamme de poids moléculaire de 6,5 kDa à 200 kDa (Biorad, France).

La préparation des échantillons est la suivante. Au volume correspondant à 50 µg de protéines est ajouté un volume identique de tampon de Laemmli contenant 5% de β-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, France). Le mélange est chauffé 5 minutes à 90°C, puis déposé dans le puits d'un gel d'électrophorèse d'épaisseur 1,5 mm en présence de SDS. La composition des gels est la suivante :

- Gel de concentration : acrylamide 4%, tampon pH=6,8 (Tris base 60 mg/mL, SDS)
- Gel de séparation : acrylamide 8%, tampon pH=8,8 (Tris base 180 mg/mL, SDS)

La migration est réalisée à ampérage constant (35 mA par gel – 200 V), dans un tampon de migration Tris/Glycine/SDS (Biorad, France) et dure environ 1h30. Le gel est ensuite placé au contact d'une membrane nitrocellulosique Hybond ECL (GE Healthcare, Royaume-Uni), entre deux feuilles de papier Whatmann imbibées de tampon de transfert Tris/Glycine (Biorad, France) et le transfert est réalisé par application d'un courant de 100V pendant 45 minutes.

3. Immunodétection des protéines d'intérêt

Les membranes sont découpées pour ne conserver que la zone contenant la protéine d'intérêt (ICAM-1 : 99 kDa, VCAM : 90 kDa, contrôle interne = actine : 42 kDa). Elles sont ensuite incubées 1 heure dans une solution de lait écrémé en poudre à 5% à température ambiante pour blocage des sites d'interactions non spécifiques, puis dans une solution de lait à 5% contenant l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt (tableau 7), dilué à 1µg/mL à 4°C pendant la nuit.

Après lavage, les membranes étaient mises à incuber 3 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière, sous agitation douce avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase HRP. La révélation se faisait par chimiluminescence, au moyen du kit Amersham

ECL (GE Healthcare, Royaume-Uni) et par exposition à un film Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Royaume-Uni).

Après numérisation, les valeurs de densité optique étaient évaluées au moyen du logiciel ImageJ. Les valeurs étaient normalisées par calcul du rapport de l'intensité du signal de la protéine d'intérêt sur le signal de l'actine pour chaque échantillon.

Tableau 7 : Anticorps utilisés pour l'analyse protéique.

Cible	Espèce productrice	Dilution	Fournisseur	Référence
<i>Anticorps primaires</i>				
Actine	Lapin	0,33 µg/µL	Sigma-Aldrich	A2066
ICAM-1	Lapin	1 µg/µL	Santa Cruz	SC-1511
VCAM	Chèvre	1 µg/µL	Santa Cruz	SC-1504
<i>Anticorps secondaires</i>				
Peroxidase Horse Anti-Goat IgG Antibody	Cheval	1/25 000	Vector	PI-9500
Peroxidase Goat Anti-Rabbit IgG Antibody	Chèvre	1/25 000	Vector	PI-1000

I. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel SPSS 20.0 (IBM, Etats-Unis). Les résultats sont donnés sous la forme « moyenne +/- déviation standard » ou sous la forme « médiane (interquartile 1 ; interquartile 3) » s'ils ont été comparés par un test non paramétrique. Le seuil de significativité a été fixé à $p=0,05$. Les valeurs de p présentées sont les valeurs ajustées après correction de Bonferroni.

Avant toute analyse, la distribution des données a été testée par un test de Shapiro-Wilk et l'homogénéité des variances par un test de Levene. Si les conditions d'application étaient satisfaites, l'analyse était poursuivie par un test paramétrique : test de Student ou analyse de variance (ANOVA) suivie, s'il existait une différence significative, par un test de Bonferroni. Si les conditions d'application n'étaient pas remplies, les données étaient comparées par un test de Kruskal-Wallis suivi, s'il existait une différence significative, par une comparaison deux à deux par un test de Mann et Whitney.

Les tests statistiques suivants ont été utilisés :

- les taux de mortalité ont été comparés par un test du χ^2 ;

- les masses corporelles moyennes et les résultats des tests comportementaux ont été comparés par une analyse de variance en mesures répétées (temps*traitement), suivi d'une analyse post-hoc par un test de Bonferroni ;
- les délais de retrait moyen des morceaux d'adhésif à la fin de la période d'apprentissage ont été comparés par un test de Student pour échantillons appariés ;
- les volumes lésionnels ont été comparés par une analyse de variance à un facteur (traitement) ;
- les résultats issus de l'analyse des tests biochimiques ont été comparés par une analyse de variance à un facteur (traitement) ou par un test de Kruskal-Wallis.

Sur les figures, les données sont présentées sous la forme « moyenne +/- SEM », sauf mention contraire.

RESULTATS

I. Effet neuroprotecteur de l'atorvastatine à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale

A. Suivi des animaux

1. Effectifs et mortalité

i. Protocole 24 heures

71 animaux ont été soumis à ischémie-reperfusion dans le cadre du protocole de traitement pendant 24 heures : 24 ont été traités par véhicule, 23 par atorvastatine 10 mg/kg/jour et 24 par atorvastatine 20 mg/kg/jour. Seuls ont été inclus les animaux survivant à la fin de la période de suivi et présentant une lésion correspondant au territoire de l'ACM (figure 25). La répartition des animaux inclus est détaillée dans le tableau 8.

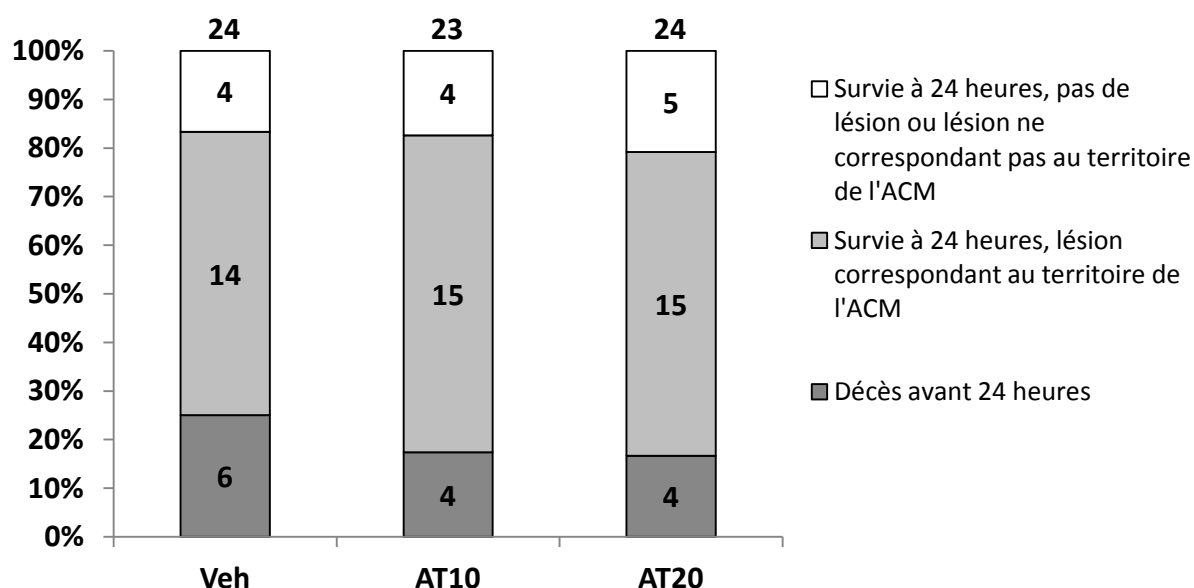


Figure 25 : Répartition des effectifs et issue à 24 heures de reperfusion.

Il n'existait pas de différence des taux de mortalités entre les différents groupes. 25% des animaux décédaient avant 24 heures dans le groupe véhicule, contre 17,40% dans le groupe AT10 et 16,6% dans le groupe AT20 ($\chi^2=0,643$; $p=0,725$).

Tableau 8 : Répartition des animaux pour les différentes manipulations à 24 heures de reperfusion.

Répartition des effectifs	IR+Veh	IR+AT10	IR+AT20
Histologie	8	9	9
Biologie moléculaire	6	6	6
Dont ACM prélevée pour étude de la réactivité vasculaire	3 (2 exploitables)	1 (0 exploitable)	2 (1 exploitable)
Total	14	15	15

Les résultats de biologie moléculaire et de réactivité vasculaire ne seront pas présentés dans ce manuscrit car ces deux protocoles sont toujours en cours (juillet 2013).

ii. Protocole 72 heures

175 animaux ont été soumis à ischémie-reperfusion et inclus dans le protocole 72 heures : 64 dans le groupe véhicule, 66 dans le groupe AT10 et 45 dans le groupe AT20. Le critère d'inclusion en termes de lésion ischémique était le même que dans le protocole 24 heures. Les effectifs sont présentés dans la figure 26. Deux animaux (un dans le groupe IR+Veh, un dans le groupe IR+AT20) ont été exclus car ils présentaient des hémorragies massives. La répartition des animaux inclus est détaillée dans le tableau 9.

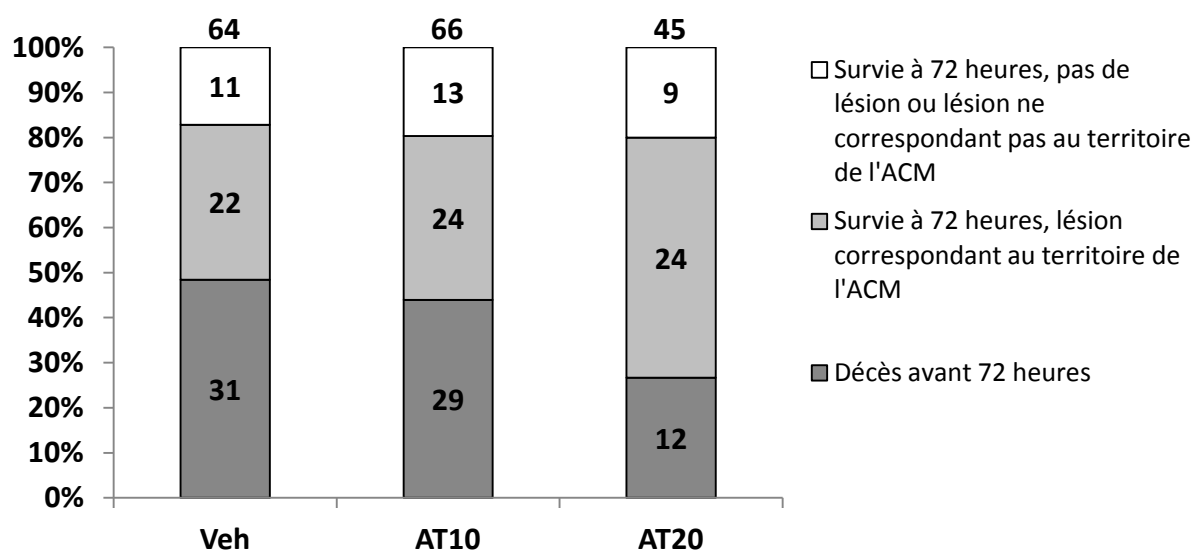


Figure 26 : Répartition des effectifs et issue à 72 heures de reperfusion.

Concernant la mortalité avant la fin du suivi, les fréquences tendaient à différer : 48,44% des animaux traités par véhicule décédaient avant 72 heures, contre 43,94% des animaux traités par atorvastatine 10 mg/kg/jour et 26,67% des animaux du groupe atorvastatine 20 mg/kg/jour ($\chi^2=5,514$; $p=0,063$).

Tableau 9 : Répartition des animaux pour les différentes manipulations à 72 heures de reperfusion.

Répartition des effectifs	IR+Veh	IR+AT10	IR+AT20
Histologie	10	10	10
Biologie moléculaire	7	7	7
Réactivité vasculaire	5 (3 exploitables)	7 (4 exploitables)	7 (5 exploitables)
Total	22	24	24

2. Evolution de la masse corporelle

L'évolution de la masse corporelle (tableau 10) a été comparée par une analyse de variance en mesures répétées et ne différait pas entre les groupes après chirurgie ($F_{(6,123)} = 1,89$; $p=0,092$). La masse corporelle décroissait significativement au cours du temps ($F_{(3,123)} = 213,95$; $p<0,001$), sans effet du traitement ($F_{(2,123)} = 0,21$; $p=0,81$).

Tableau 10 : Evolution des masses corporelles après ischémie-reperfusion.

Masse corporelle	Groupe véhicule (n=15)	Groupe AT10 (n=14)	Groupe AT20 (n=15)
Avant chirurgie	29,50 +/- 0,55 g	29,82 +/- 0,98 g	29,62 +/- 0,96 g
24 heures	25,33 +/- 0,52 g	26,64 +/- 0,81 g	26,54 +/- 0,78 g
48 heures	24,33 +/- 1,03 g	24,36 +/- 0,67 g	24,38 +/- 1,04 g
72 heures	24,00 +/- 1,67 g	23,09 +/- 1,30 g	23,54 +/- 1,81 g

B. Volume lésionnel

1. Impact à 24 heures de reperfusion

Il n'existait pas de différence entre les groupes véhicule et atorvastatine 10 mg/kg/jour en termes de volumes d'infarctus. Le volume d'infarctus total était significativement diminué

chez les animaux traités par atorvastatine 20 mg/kg/jour par rapport aux groupes véhicule et atorvastatine 10 mg/kg/jour ($F_{(2,23)} = 6,91$; $p=0,004$) soit une diminution de 25% (tableau 11, figure 27). Le volume d'infarctus cortical était également réduit ($F_{(2,23)} = 5,41$; $p=0,012$). L'infarctus striatal n'était significativement réduit que dans le groupe IR+AT20 ($F_{(2,23)} = 6,60$; $p=0,005$). Le volume d'œdème diminuait de manière dose-dépendante chez les animaux traités ($F_{(2,23)} = 14,27$; $p<0,001$).

Tableau 11 : Volumes lésionnels moyens évalués à 24 heures de reperfusion.

	IR+Veh	IR+AT10	IR+AT20
Infarctus total	33,26 +/- 4,44 mm³	31,65 +/- 2,59 mm³	25,03 +/- 6,70 mm³ p=0,026 vs. IR+AT10 p=0,006 vs. IR+Veh
Infarctus cortical	27,19 +/- 4,15 mm³	26,75 +/- 2,18 mm³	21,16 +/- 5,73 mm³ p=0,033 vs. IR+AT10 p=0,025 vs. IR+Veh
Infarctus striatal	6,07 +/- 1,55 mm³	4,90 +/- 0,69 mm³	3,87 +/- 1,38 mm³ p=0,004 vs. IR+Veh
Œdème	18,52 +/- 3,35 mm³	13,62 +/- 4,53 mm³ p=0,035 vs. IR+Veh	8,98 +/- 2,92 mm³ p=0,041 vs. IR+AT10 p<0,001 vs. IR+Veh

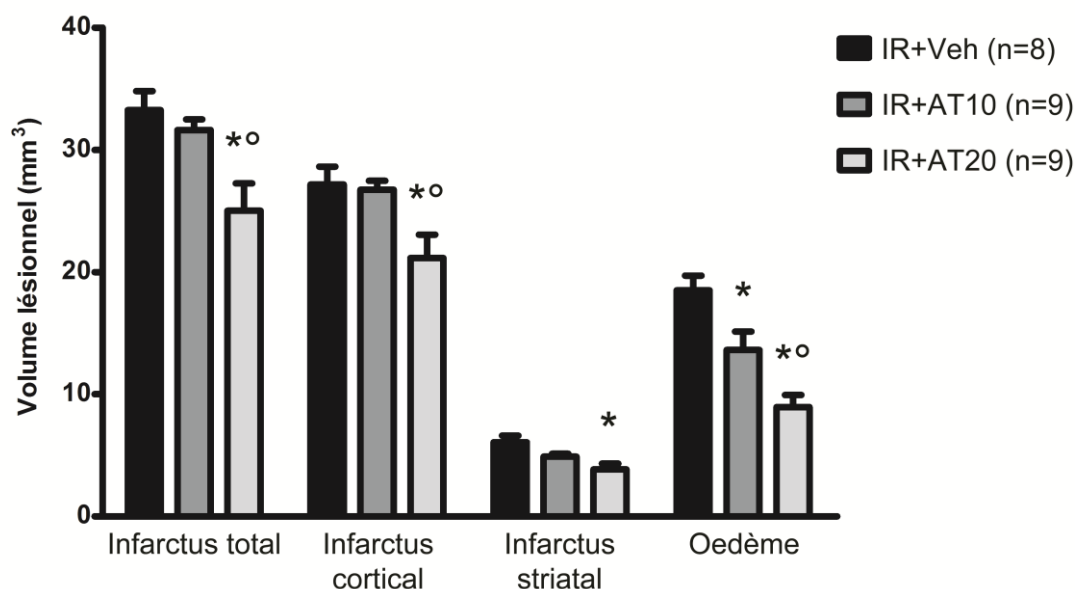


Figure 27 : Volumes lésionnels à 24 heures de reperfusion.

*p<0,05 vs. IR+Veh. ° p<0,05 vs. IR+AT10.

2. Impact à 72 heures de reperfusion

72 heures après ischémie-reperfusion, la dose de 10 mg/kg/jour n'avait plus d'impact bénéfique. La dose de 20 mg/kg/jour était au contraire responsable d'une réduction significative du volume lésionnel chez les animaux traités ($F_{(2,26)} = 5,53$; $p=0,010$) (tableau 12, figure 28). La lésion était réduite au niveau cortical ($F_{(2,26)} = 6,10$; $p=0,007$). Il n'existait par contre plus d'effet sur la lésion striatale ($F_{(2,26)} = 2,50$; $p=0,101$; NS). Le volume d'œdème était comme à 24 heures réduits chez les animaux traités, mais sans dose-dépendance, l'effet était uniquement présent chez les animaux traités à la plus forte dose ($F_{(2,26)} = 5,53$; $p=0,010$).

Tableau 12 : Volumes lésionnels moyens évalués à 72 heures de reperfusion.

	IR+Veh	IR+AT10	IR+AT20
Infarctus total	37,60 +/- 7,28 mm³	36,66 +/- 6,87 mm³	26,81 +/- 9,46 mm³ p=0,037 vs. IR+AT10 p=0,017 vs. IR+Veh
Infarctus cortical	31,16 +/- 5,09 mm³	31,24 +/- 5,74 mm³	22,57 +/- 7,76 mm³ p=0,018 vs. IR+AT10 p=0,016 vs. IR+Veh
Infarctus striatal	6,43 +/- 2,44 mm³	5,42 +/- 1,50 mm³	4,24 +/- 2,45 mm³
Œdème	15,67 +/- 6,12 mm³	13,42 +/- 3,94 mm³	7,65 +/- 6,14 mm³ p=0,010 vs. IR+Veh

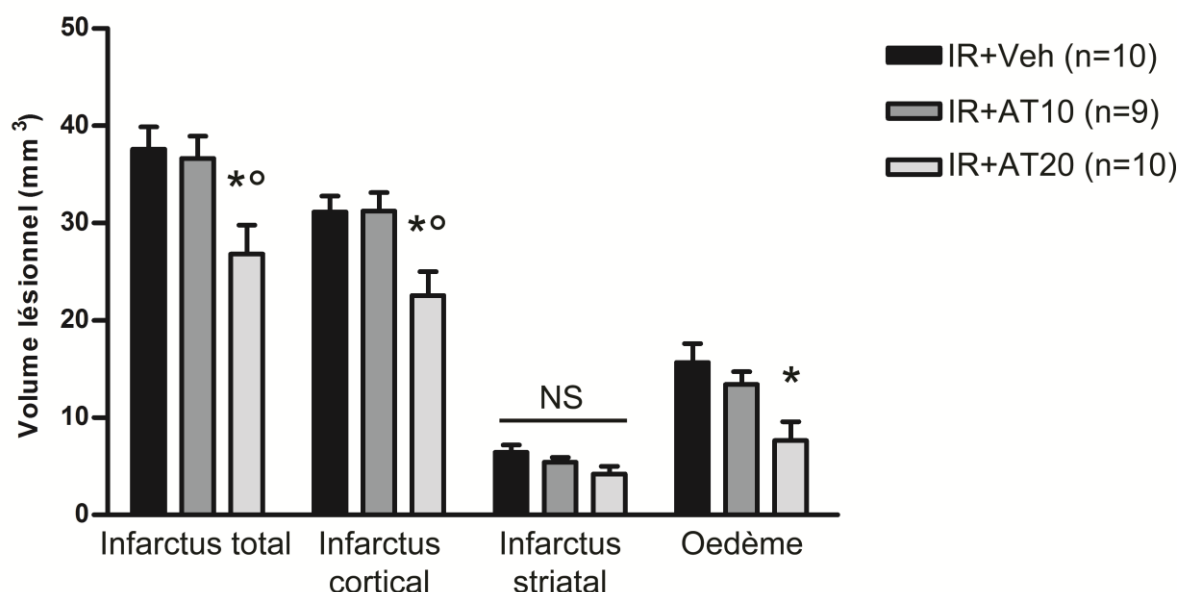


Figure 28 : Volumes lésionnels à 72 heures de reperfusion.*p<0,05 vs. IR+Veh. ° p<0,05 vs. IR+AT10.

C. Récupération fonctionnelle

1. Score neurologique

L'évolution des scores neurologiques moyens (figure 29) était comparable au cours du temps ($F_{(2,41)} = 1,44$; $p=0,25$; NS), ils décroissaient entre 24 et 72 heures de reperfusion, signant une diminution du déficit neurologique au cours du temps ($F_{(1,41)} = 4,13$; $p=0,049$). Le traitement diminuait significativement le déficit neurologique ($F_{(1,41)} = 6,18$; $p=0,004$), les animaux du groupe IR+AT20 présentaient une meilleure récupération fonctionnelle avec des scores peu élevés : à 24 heures de reperfusion $1,60 \pm 1,05$ et à 72 heures de reperfusion $1,07 \pm 0,96$. Ces scores différaient significativement des scores des deux autres groupes : groupe IR+AT10 : à 24 heures de reperfusion $2,36 \pm 0,93$ et à 72 heures $2,29 \pm 1,14$ ($p=0,016$) ; groupe IR+Veh : à 24 heures de reperfusion $2,47 \pm 0,95$ et à 72 heures $2,33 \pm 0,90$ ($p=0,007$). Il n'existait pas de différence entre les groupes IR+Veh et IR+AT10 ($p=1$; NS).

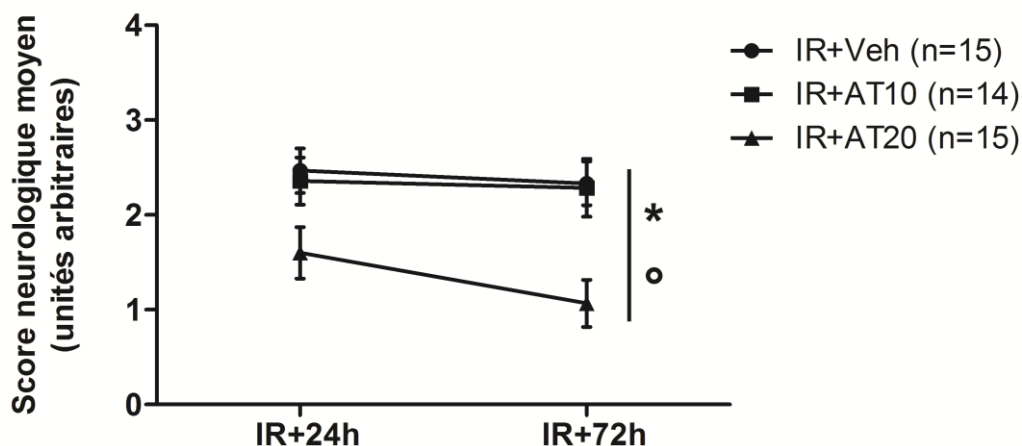


Figure 29 : Evolution des scores neurologiques moyens. * $p < 0,05$ vs. IR+Veh. ° $p < 0,05$ vs. IR+AT10.

2. Grip test

La force de traction (figure 30) exercée augmentait de façon comparable ($F_{(2,41)} = 2,26$; $p = 1,12$; NS) au cours du temps ($F_{(1,41)} = 5,71$; $p = 0,021$). Elle était significativement plus importante chez les animaux du groupe IR+AT20 ($F_{(1,41)} = 9,16$; $p < 0,001$) : à 24 heures de reperfusion $0,86 \pm 0,17$ N, à 72 heures $0,98 \pm 0,18$ N ; contre, pour le groupe IR+AT10 $0,69 \pm 0,17$ N à 24 heures de reperfusion et $0,68 \pm 0,16$ N à 72 heures ($p = 0,018$) ; et pour le groupe IR+Veh $0,58 \pm 0,21$ N à 24 heures et $0,64 \pm 0,18$ N à 72 heures ($p < 0,001$). Il n'existait pas de différence entre les groupes IR+Veh et IR+AT10 ($p = 0,998$; NS).

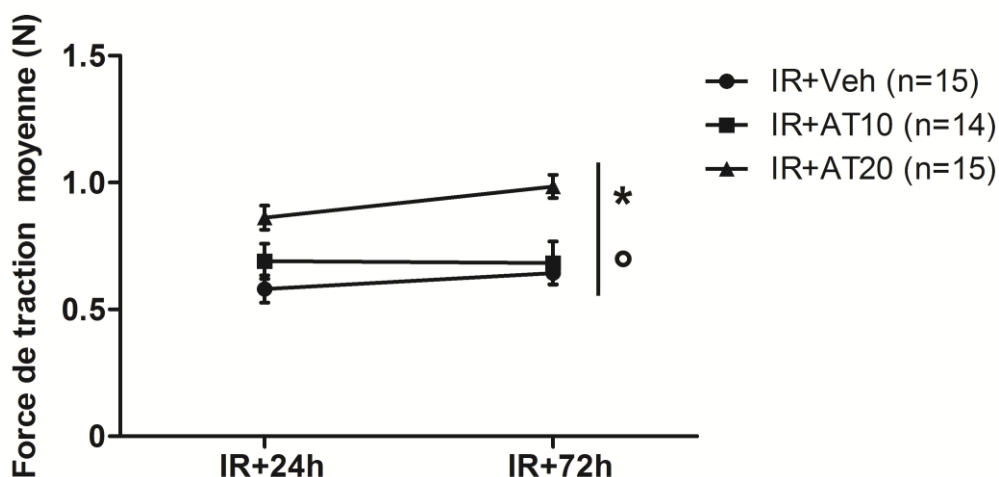


Figure 30 : Résultats du grip test - Evolution de la force de traction moyenne

* $p < 0,05$ vs. IR+Veh. ° $p < 0,05$ vs. IR+AT10.

3. Test de la barre

Le temps de maintien sur la barre (figure 31) augmentait de façon comparable chez tous les animaux ($F_{(2,41)} = 2,36$; $p=0,107$; NS) avec le délai de reperfusion ($F_{(1,41)} = 32,36$; $p<0,001$). Le temps de maintien était significativement allongé chez les animaux traités ($F_{(1,41)} = 4,15$; $p=0,023$). Les animaux du groupe IR+AT20 présentaient un temps de maintien moyen de 17,02 +/- 15,55 secondes à 24 heures de reperfusion et de 37,49 +/- 21,14 secondes à 72 heures. Ils étaient significativement supérieurs aux temps du groupe IR+Veh : temps de maintien moyen à 24 heures 6,64 +/- 10,52 secondes et à 72 heures 16,89 +/- 11,88 secondes ($p=0,021$). Le groupe IR+AT10 ne différait pas significativement des deux autres groupes : temps moyen de maintien à 24 heures 12,67 +/- 16,64 secondes et à 72 heures 21,93 +/- 22,20 secondes ($p=0,972$ vs. IR+Veh, $p=0,239$ vs. IR+AT20 ; NS).

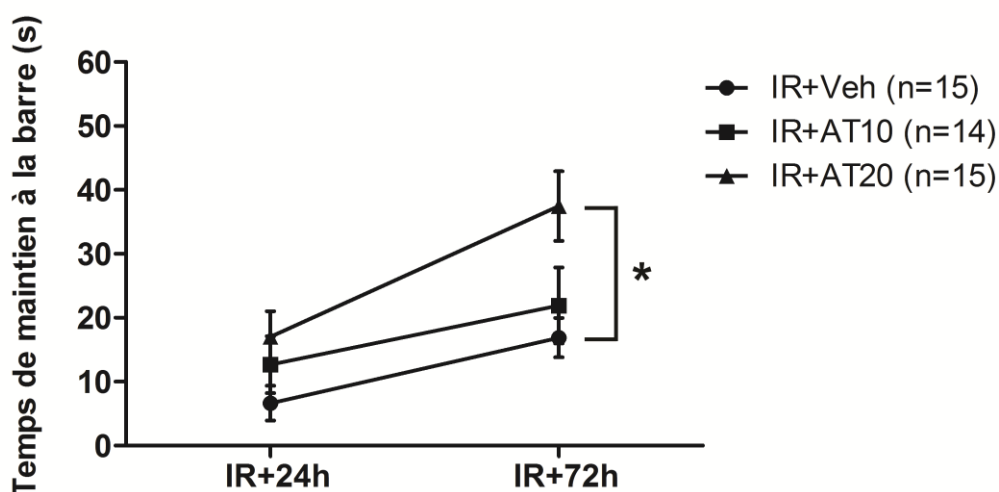


Figure 31 : Résultats du test de la barre - Evolution du temps de maintien moyen.

* $p<0,05$ vs. IR+Veh.

4. Test du retrait de l'adhésif

Trois paramètres étaient évalués dans ce test : le délai de détection des morceaux d'adhésif, le délai de retrait du morceau d'adhésif collé sur la patte avant gauche, soit du côté contralatéral à la lésion, et le délai du morceau d'adhésif de la patte avant droite, du côté ipsilatéral à la lésion.

i. Bilan de l'apprentissage

Les délais moyens de retrait 24 heures avant induction de l'ischémie-reperfusion cérébrale était de 5,00 +/- 2,71 secondes pour le côté gauche et 5,23 +/- 2,64 secondes pour le

côté droit. Il n'existait pas de différence significative ($t=0,449$; $p=0,656$; NS). Deux animaux ont été exclus pour défaut d'apprentissage (retrait d'au moins un des deux morceaux d'adhésif en plus de 10 secondes).

ii. Tests après ischémie-reperfusion

Les délais de détection (figure 32) diminuaient de façon comparable ($F_{(2,41)} = 0,12$; $p=0,884$; NS) au cours du temps ($F_{(1,41)} = 9,44$; $p=0,004$). Les animaux traités par atorvastatine 20 mg/kg/jour détectaient plus rapidement la présence des morceaux d'adhésif ($F_{(1,41)} = 4,21$; $p=0,022$) : délais moyens de détection pour le groupe IR+AT20 : 30,69 +/- 40,04 secondes à 24 heures et 18,58 +/- 24,95 secondes à 72 heures ; contre pour le groupe IR+AT10 56,03 +/- 44,21 secondes à 24 heures et 37,88 +/- 40,60 secondes à 72 heures ($p=0,325$; NS) ; et pour le groupe IR+Veh 71,33 +/- 41,38 secondes à 24 heures et 55,13 +/- 46,74 secondes à 72 heures ($p=0,019$). A la dose de 10 mg/kg/jour, l'atorvastatine n'influait pas le délai de détection ($p=0,713$ vs. IR+Veh ; NS).

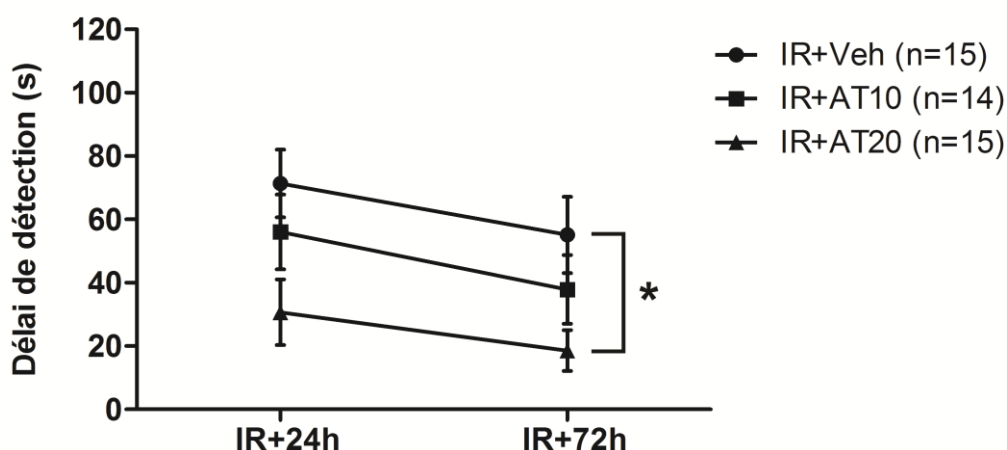


Figure 32 : Résultats du test du retrait de l'adhésif - Evolution du délai de détection.

* $p<0,05$ vs. IR+Veh.

L'évolution des délais de retrait concernant la patte gauche (figure 33) ne différait pas entre les groupes ($F_{(2,41)} = 0,80$; $p=0,457$; NS), ils décroissaient alors que la durée de reperfusion augmentait ($F_{(1,41)} = 25,58$; $p<0,001$). Les animaux du groupe IR+AT20 étaient capables de retirer le morceau d'adhésif collé sur la patte gauche plus rapidement ($F_{(1,41)} = 3,90$; $p=0,028$) : délais moyens de retrait 82,38 +/- 40,92 secondes à 24 heures et 55,07 +/- 44,20 secondes à 72 heures ; contre dans le groupe IR+AT10 96,57 +/- 35,52 secondes à 24 heures et 81,42 +/- 45,88 secondes à 72 heures ($p=0,347$; NS) ; et dans le groupe IR+Veh

112,51 +/- 14,04 secondes à 24 heures et 93,78 +/- 28,95 secondes à 72 heures ($p=0,025$). Les délais de retrait moyen du groupe IR+AT10 ne différaient pas significativement du groupe IR+Veh ($p=0,805$; NS).

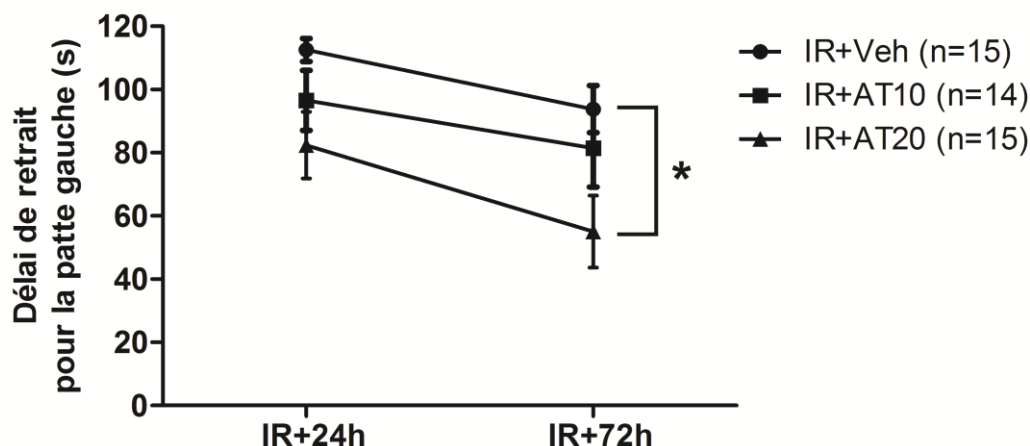


Figure 33 : Résultats du test du retrait de l'adhésif - Evolution du délai de retrait pour la patte gauche. * $p<0,05$ vs. IR+Veh.

Enfin, de même que pour le côté gauche, l'évolution des délais de retrait des morceaux d'adhésif collés sur la paume de la patte avant droit (figure 34) était similaire entre les trois groupes ($F_{(2,41)} = 1,22$; $p=0,307$; NS). Ces délais décroissaient au cours du temps ($F_{(1,41)} = 23,59$; $p<0,001$). Le traitement par atorvastatine tendait à réduire le délai de retrait pour la patte droite ($F_{(141)} = 3,01$; $p=0,060$; NS).

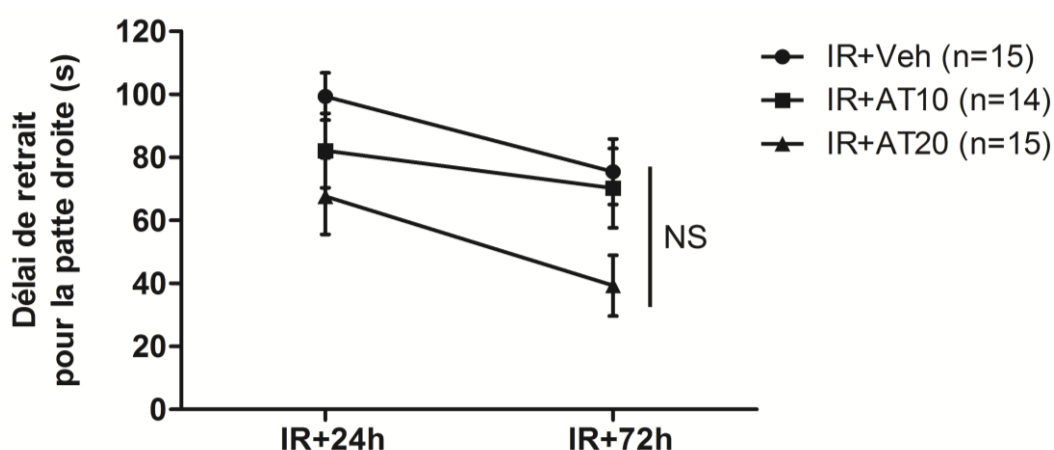


Figure 34 : Résultats du test du retrait de l'adhésif - Evolution du délai de retrait pour la patte droite.

5. Résultats des tests pour les animaux sham

Quinze animaux sham ont été soumis aux mêmes tests fonctionnels que les animaux soumis à ischémie-reperfusion cérébrale. Aucun animal n'a été exclu pour échec d'apprentissage dans le test du retrait de l'adhésif ($t=-0,611$; $p=0,551$) : délais de retrait moyen pour la patte droite : $4,14 \pm 2,14$ secondes, et pour la patte gauche : $4,36 \pm 2,24$ secondes.

Les résultats sont donnés dans le tableau 13 et ont également été comparés par une analyse de variance en mesures répétées, qui n'a mis en évidence aucune différence significative entre les trois groupes. Il existait toutefois un effet temps significatif dans les tests de la barre et du retrait de l'adhésif.

Tableau 13 : Résultats des tests fonctionnels pour les animaux sham.

	Sham + Veh (n=5)		Sham + AT10 (n=5)		Sham + AT20 (n=5)	
	IR+24h	IR+72h	IR+24h	IR+72h	IR+24h	IR+72h
Score neurologique						
	0	0	0	0	0	0
Grip test						
Force de traction (N)	1,37 $\pm$ 0,15	1,22 $\pm$ 0,04	1,27 $\pm$ 0,14	1,27 $\pm$ 0,10	1,33 $\pm$ 0,16	1,29 $\pm$ 0,16
Test de la barre						
Temps de maintien (s)	55,47 $\pm$ 6,22	60,00	54,67 $\pm$ 6,18	60,00	54,67 $\pm$ 7,67	60,00
Test du retrait de l'adhésif						
Délai de détection (s)	3,10 $\pm$ 0,42	1,80 $\pm$ 0,91	2,80 $\pm$ 1,99	1,30 $\pm$ 0,45	2,20 $\pm$ 1,15	1,40 $\pm$ 0,42
Délai de retrait pour la patte gauche (s)	6,00 $\pm$ 1,70	4,20 $\pm$ 2,41	5,60 $\pm$ 3,75	3,50 $\pm$ 1,50	3,90 $\pm$ 2,07	3,10 $\pm$ 2,04
Délai de retrait pour la patte droite (s)	6,00 $\pm$ 1,62	4,10 $\pm$ 2,16	5,80 $\pm$ 2,82	2,90 $\pm$ 0,82	6,40 $\pm$ 1,47	5,30 $\pm$ 1,15

II. Effets vasculaires de l'atorvastatine à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale

A. Impact sur la dysfonction endothéliale post-ischémique

Seuls les résultats obtenus à 72 heures de reperfusion seront présentés dans ce manuscrit. Le groupe Sham+AT10, ne comprenant pour le moment qu'un seul animal (juillet 2013), n'a pas été inclus dans l'analyse statistique. Le même protocole a été débuté à 24

heures de reperfusion, et n'inclut pour le moment que peu d'animaux (IR+Veh : n=2 ; IR+AT20 : n=1 ; Sham+AT10 n=2 ; Sham+AT20 n=1). Les résultats n'ont pas été intégrés à ce manuscrit.

1. Etude de la relaxation endothélium-dépendante

i. Effet concentration/réponse à la carbamoylcholine

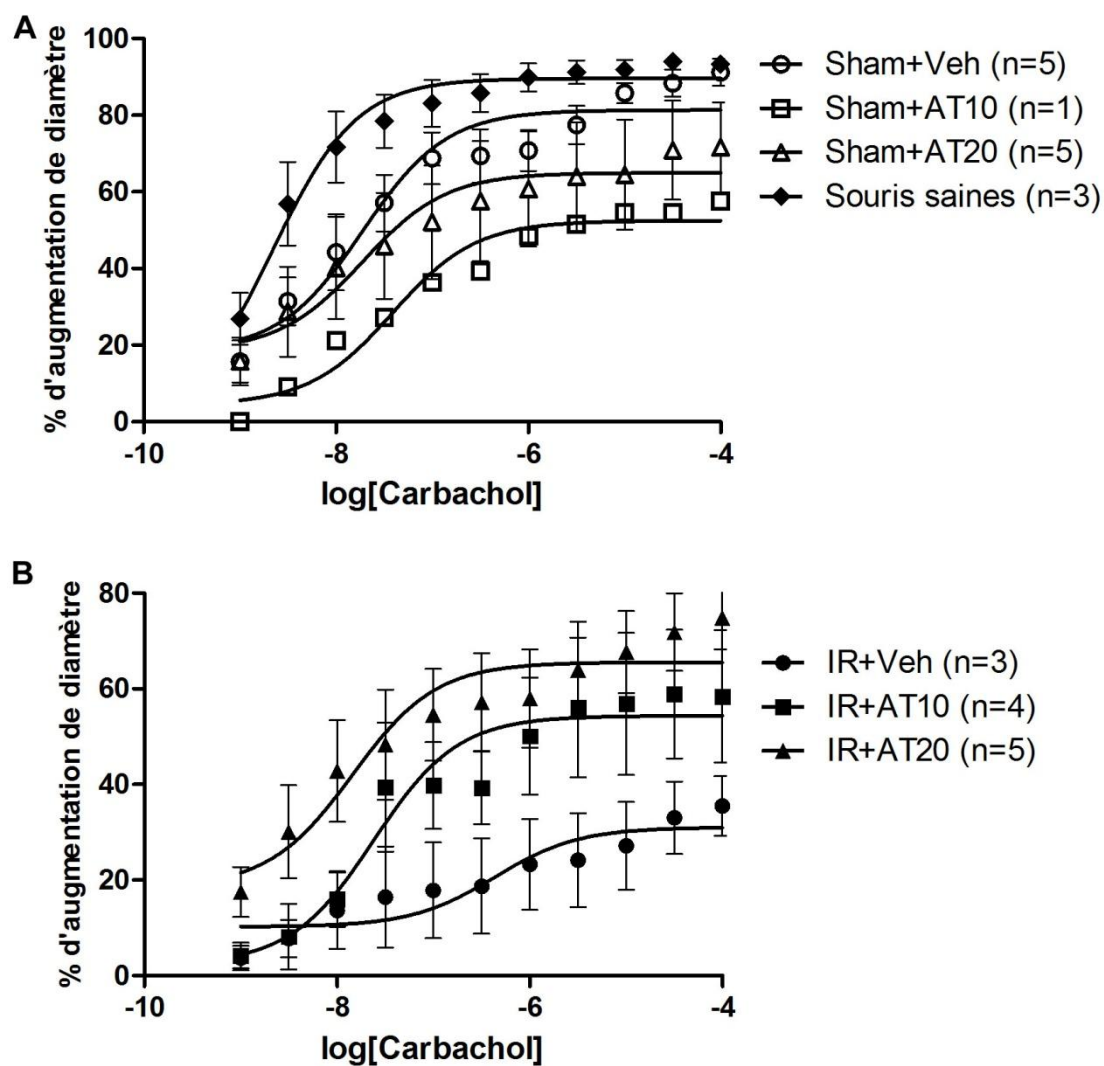


Figure 35: Courbes concentration-réponse à la carbamoylcholine : effet d'un traitement de 72 heures par atorvastatine. A : animaux sham et non opérés. B : animaux soumis à ischémie-reperfusion cérébrale.

Le traitement par atorvastatine ne modifiait pas significativement la relaxation endothélium-dépendante observée en réponse à une stimulation cholinergique chez les animaux opérés non ischémiés (figure 35 panneau A). Il n'existait pas de différence en termes

de réponse maximale (tableau 14) entre les animaux sham du groupe véhicule et les animaux sham du groupe AT20 ($t=1,17$; $p=0,311$; NS).

Tableau 14 : Diamètres moyens et réponse maximale de l'ACM isolée à la carbamoylcholine chez les animaux sains et opérés non ischémiés.

	Sham+Veh	Sham+AT10	Sham+AT20
Diamètre au repos (μm)	109 +/- 3	120	112 +/- 7
Diamètre (μm) [Phe] = 10^{-4} M	71 +/- 6	87	74 +/- 9
Diamètre (μm) [CCh] = 10^{-4} M	104,62 +/- 12,28	106	102,25 +/- 12,50
% réponse	97,29 +/- 1,99	84,85	87,76 +/- 13,98

L'ischémie-reperfusion induisait une dysfonction endothéliale marquée chez les animaux du groupe véhicule (figure 35 panneau B). La réponse maximale à la carbamoylcholine était significativement réduite dans ce groupe chez les animaux ischémiés comparés aux animaux sham ($t=8,38$; $p<0,001$). Le traitement par atorvastatine tendait à préserver la fonction endothéliale chez les animaux ischémiés (tableau 15) et à améliorer la réponse maximale à la carbamoylcholine ($F_{(2,11)} = 3,89$; $p=0,061$; NS).

Tableau 15 : Diamètres moyens et réponse maximale de l'ACM isolée à la carbamoylcholine chez les animaux soumis à ischémie-reperfusion cérébrale.

	IR+Veh	IR+AT10	IR+AT20
Diamètre au repos (μm)	105 +/- 12	107 +/- 11	106 +/- 5
Diamètre (μm) [Phe] = 10^{-4} M	56 +/- 8	78 +/- 11	85 +/- 4
Diamètre (μm) [CCh] = 10^{-4} M	73 +/- 17,70	92,25 +/- 26,65	100,60 +/- 10,16
% réponse	35,47 +/- 6,21 %	58,39 +/- 13,82 %	74,84 +/- 6,51 %

ii. Sensibilité à la carbamoylcholine

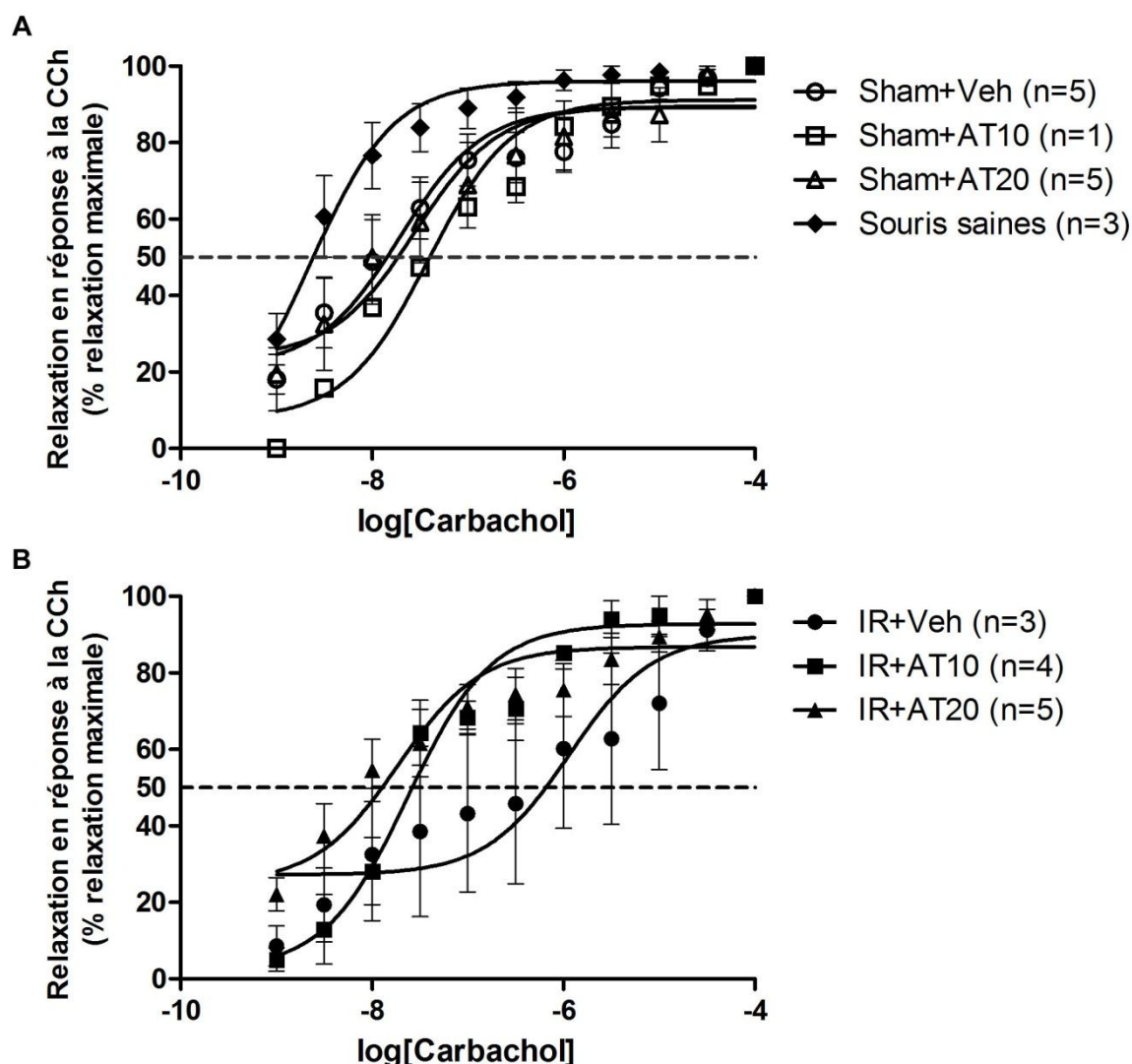


Figure 36 : Courbes concentration-réponse : sensibilité à la carbamoylcholine et estimation des CE50 à 72 heures de reperfusion. A : animaux sham et non opérés. B : animaux soumis à ischémie-reperfusion cérébrale.

Le traitement par atorvastatine ne modifiait pas la sensibilité à la carbamoylcholine chez les animaux Sham ($F_{(1,91)} = 0,15$; $p=0,701$; NS) (figure 36 panneau A). L'ischémie-reperfusion induisait une perte importante de sensibilité endothéliale au stimulus cholinergique ($F_{(2,123)} = 4,89$; $p=0,009$) (figure 36 panneau B), la valeur de la concentration efficace 50 (CE50) était fortement augmentée dans le groupe IR+Veh. L'atorvastatine permettait par contre de préserver la sensibilité à la carbamoylcholine, les CE50 étaient comparables à celles des animaux Sham dans les deux groupes traités (tableau 16).

Tableau 16 : Valeurs moyennes des CE50 (μM). * $p < 0,05$ vs. Veh

	Véhicule	AT10	AT20
Groupes sham	19,43 +/- 11,10	38,69 +/- 23,10	27,98 +/- 18,50
Groupes IR	1145 +/- 970	23,65 +/- 10,50*	18,73 +/- 11,20*

2. Etude de la relaxation endothélium-indépendante

La relaxation en réponse au SNP, un donneur de NO stimulant directement les cellules musculaires lisses, confirme que la dysfonction mise en évidence précédemment est bien d'origine endothéliale. Cette réponse n'était pas modifiée par le traitement par atorvastatine, que ce soit chez les animaux sham (tableau 17, $t=0,779$; $p=0,492$; NS) ou chez les animaux ischémiés (tableau 18, $F_{(2,11)} = 0,618$; $p=0,560$; NS).

Tableau 17 : Réponse au SNP chez les animaux sham.

	Sham+Veh	Sham+AT10	Sham+AT20
Diamètre (μm) [SNP] = 10^{-4} M	108 +/- 3	115	108 +/- 5
% réponse	97,29 +/- 0,73 %	84,85 %	87,76 +/- 12,21 %

Tableau 18 : Réponse au SNP chez les animaux ischémiés.

	IR+Veh	IR+AT10	IR+AT20
Diamètre (μm) [SNP] = 10^{-4} M	100 +/- 14	98 +/- 11	103 +/- 4
% réponse	87,16 +/- 6,82 %	73,22 +/- 14,63 %	85,35 +/- 4,37 %

3. Part jouée par la production endothéliale de NO

La part jouée par le NO libéré par les cellules endothéliales dans la relaxation après stimulation cholinergique ne paraît pas être modifiée par le traitement par atorvastatine (tableau 19). Il n'existait pas de différence significative entre les animaux des groupes Sham+Veh et Sham+AT20 ($t=0,638$; $p=0,558$; NS), ni entre les trois groupes d'animaux soumis à ischémie-reperfusion ($F_{(2,9)} = 1,28$; $p=0,335$; NS).

Tableau 19 : Part de la relaxation maximale à la CCh imputable à la production endothéliale de NO. n=3 pour chaque groupe, n=1 pour le groupe Sham+AT10.

	Véhicule	AT10	AT20
Groupes Sham	68,01 +/- 7,13 %	42,11 %	39,37 +/- 21,03 %
Groupes IR	- 8,58 +/- 24,75 %	13,60 +/- 40,62 %	49,82 +/- 19,18 %

B. Impact sur les microvaisseaux

Le collagène de type IV, constituant majeur de la lame basale, a été utilisé comme marqueur de la densité et de l'intégrité des microvaisseaux cérébraux (figure 37).

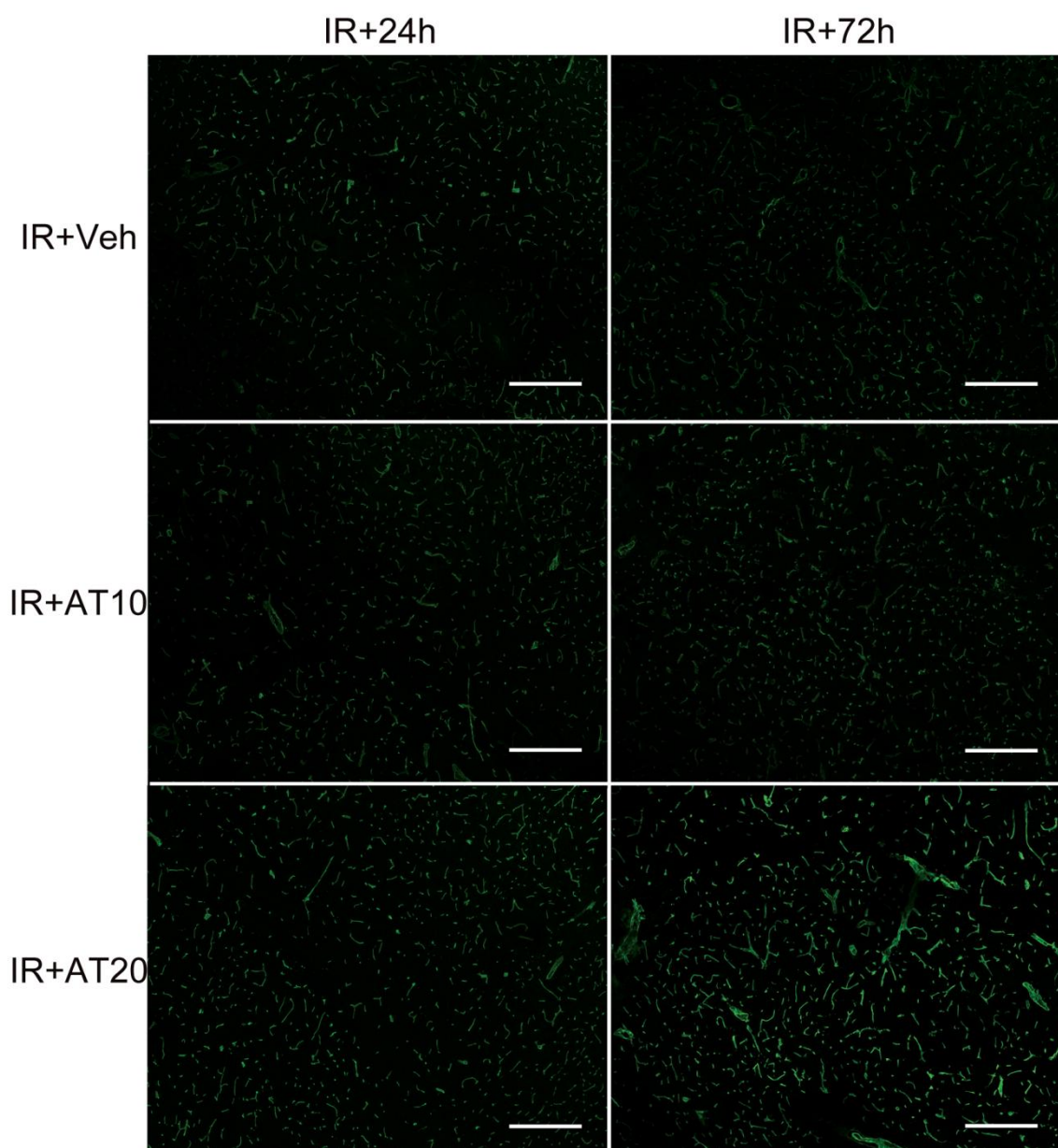


Figure 37 : Exemples de marquages pour le collagène de type IV dans la zone lésée.

Barre = 100 μm.

La densité de microvaisseaux (figure 38), reflétée par la fraction d'aire marquée, n'était pas modifiée à 24 heures de reperfusion ($F_{(2,12)} = 1,55$; $p=0,255$; NS) : pour le groupe IR+AT20 $3,92 \pm 0,80$ % ; pour le groupe IR+AT10 $3,67 \pm 0,63$ % et pour le groupe IR+Veh $2,93 \pm 1,17$ %.

Elle était par contre significativement supérieure à 72 heures de reperfusion dans le groupe IR+AT20 ($F_{(2,12)} = 4,61$; $p=0,033$) : pour le groupe IR+AT20 $6,29 \pm 1,18$ % ; pour le groupe IR+AT10 $4,74 \pm 1,75$ % ($p=0,434$; NS) ; et pour le groupe IR+Veh $3,27 \pm 1,91$ % ($p=0,031$). Le traitement par atorvastatine 10 mg/kg/jour ne modifiait pas la densité de microvaisseaux à 72 heures de reperfusion ($p=0,498$ vs. IR+Veh, NS).

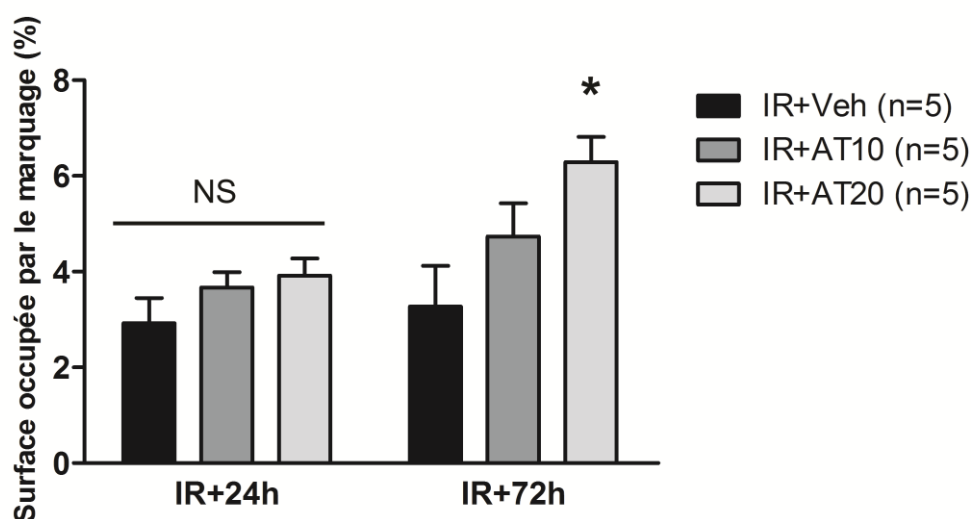


Figure 38 : Fraction d'aire occupée par le marquage du collagène de type IV à 24 et 72 heures de reperfusion dans la zone lésée. * $p<0,05$ vs. IR+Veh.

L'intensité moyenne de fluorescence (figure 39) évoluait en parallèle. Elle était comparable dans les trois groupes à 24 heures de reperfusion ($F_{(2,12)} = 1,38$; $p=0,291$) : pour le groupe IR+AT20 $1,39 \pm 0,28$; pour le groupe IR+AT10 $1,12 \pm 0,10$; et pour le groupe IR+Veh $1,10 \pm 0,41$.

Elle était significativement plus forte après 72 heures dans le groupe IR+AT20 ($F_{(2,12)} = 3,80$; $p=0,050$) : pour le groupe IR+AT20 $4,57 \pm 0,58$; pour le groupe IR+AT10 $2,94 \pm 1,56$ ($p=0,053$; NS) ; et pour le groupe IR+Veh $2,63 \pm 1,32$ ($p=0,025$). Le traitement par atorvastatine 10 mg/kg/jour n'influait l'intensité moyenne de fluorescence ($p=0,711$ vs. IR+Veh, NS).

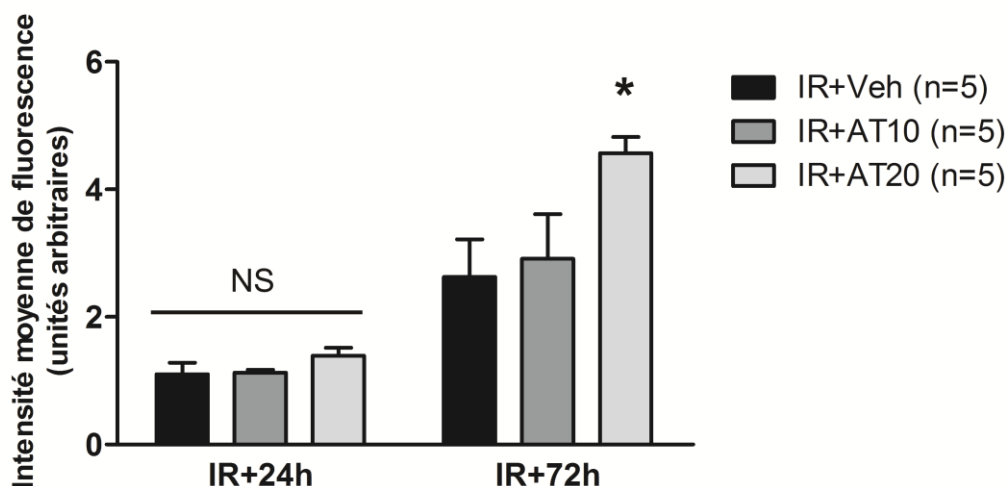


Figure 39 : Intensité moyenne de fluorescence pour le marquage du collagène de type IV à 24 et 72 heures de reperfusion dans la zone lésée. * $p < 0,05$ vs. IR+Veh.

C. Impact sur les interactions entre leucocytes et endothélium

1. Adhésion leucocytaire : marquage de la protéine d'adhésion ICAM-1

L'expression de la protéine d'adhésion ICAM-1 (figure 40) était fortement induite dans l'hémisphère lésé 24 heures après ischémie-reperfusion (figure 41). Cette induction était contrée par le traitement par atorvastatine à la dose de 20 mg/kg/jour ($H=9,40$; $p=0,009$). Le nombre médian de vaisseaux marqués était significativement plus faible dans le groupe IR+AT20 : 30,31 (interquartiles : 24,94 ; 36,00) ; contre pour le groupe IR+AT10 38,37 (interquartiles : 35,37 ; 45,62) ($p=1$) ; et pour le groupe IR+Veh 94,87 (interquartiles : 60,25 ; 135,00) ($p=0,009$). Le traitement par atorvastatine à la dose de 10 mg/kg/jour ne modifiait pas significativement le nombre de vaisseaux immunopositifs pour ICAM-1 ($p=0,133$ vs. IR+Veh, NS).

A 72 heures de reperfusion, le nombre de vaisseaux immunomarqués diminuait sensiblement dans les trois groupes, aucun effet du traitement n'était mis en évidence ($F_{(2,12)} = 0,69$; $p=0,524$; NS). (figure 41).

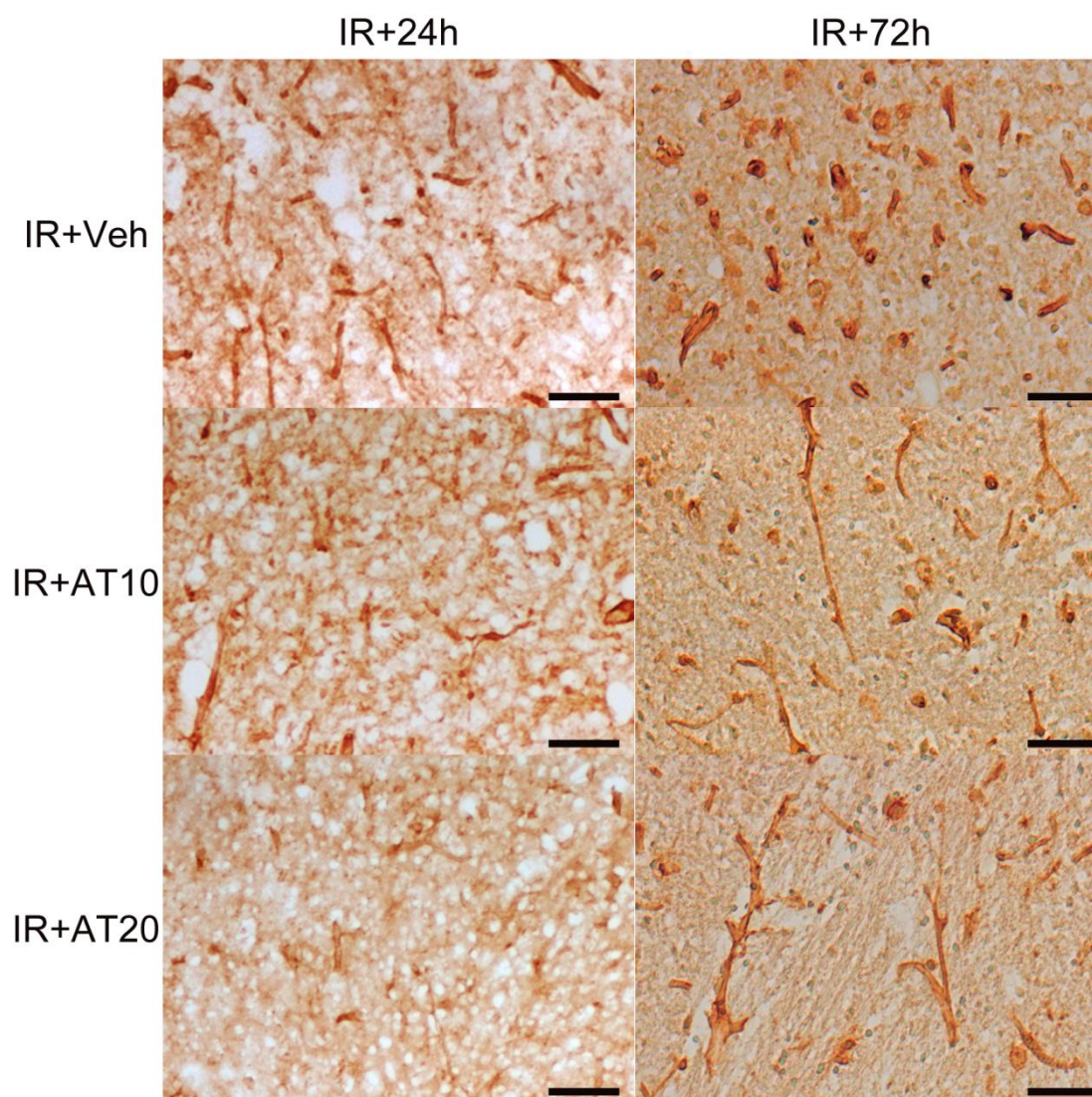


Figure 40 : Exemples de marquages pour ICAM-1 dans la zone lésée (barre = 50 μ m).

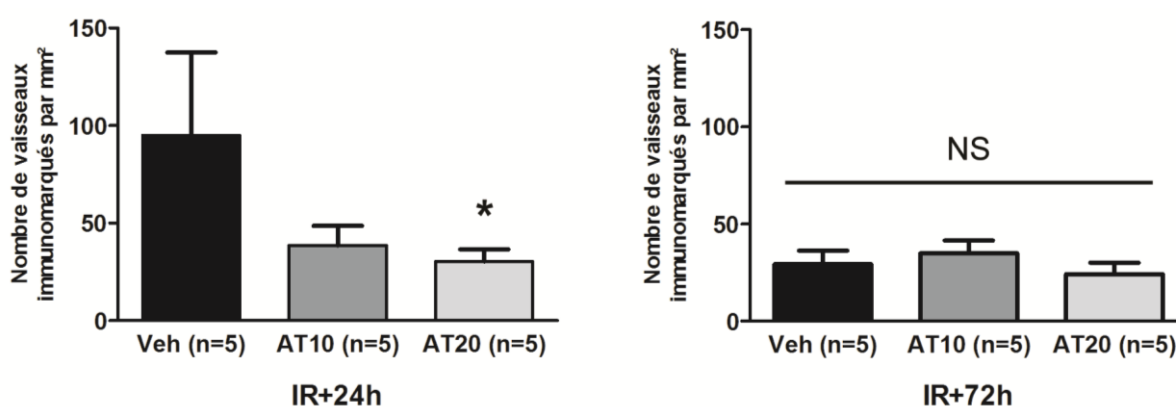


Figure 41 : Nombre moyen de vaisseaux immunomarqués pour ICAM-1 dans la zone lésée à 24 et 72 heures de reperfusion. * $p < 0,05$ vs. IR+Veh. NB : les résultats à 24 heures de reperfusion sont présentés sous la forme « médiane + intervalle interquartile ».

2. Infiltration des polynucléaires neutrophiles : marquage de la myéloperoxydase

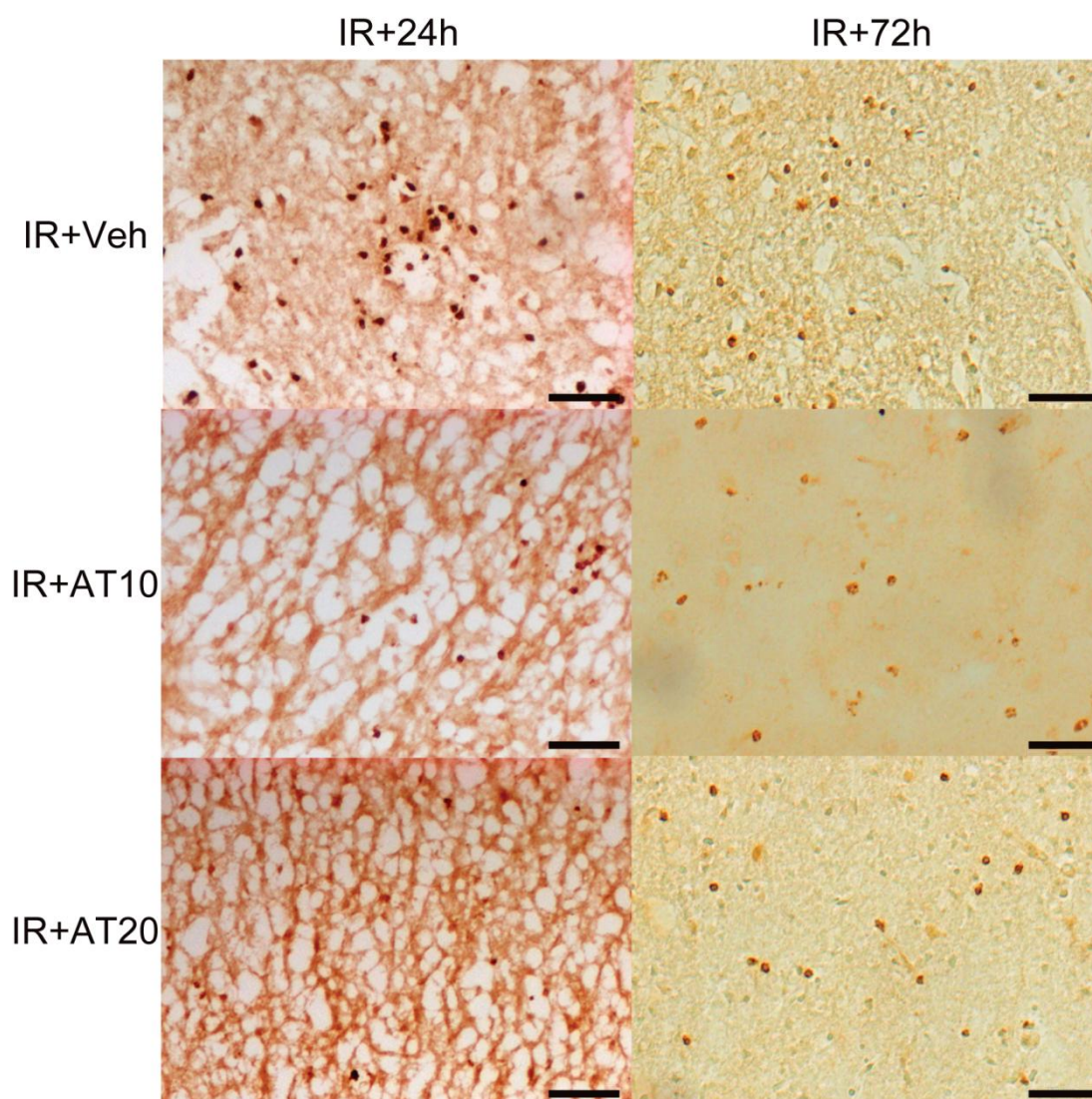


Figure 42 : Exemples de marquages pour la myéloperoxydase à 24 et 72 heures de reperfusion (barre = 100 μm).

Le traitement par atorvastatine à la dose de 20 mg/kg/jour permettait de réduire l'infiltration des polynucléaires neutrophiles, identifiés par l'immunomarquage de la peroxydase (figure 42) dans le parenchyme lésé 24 heures après ischémie-reperfusion ($H=6,03$; $p=0,049$). A 24 heures, le compte médian de cellules immunomarquées (figure 43) était dans le groupe IR+AT20 de 18,50 (interquartiles : 11,83 ; 19,00) ; contre pour le groupe IR+AT10 58,29 (interquartiles : 21,83 ; 79,79) ($p=0,390$; NS) et pour le groupe IR+Veh

57,83 (interquartiles : 32,50 ; 99,00) ($p=0,047$). L'infiltration des polynucléaires neutrophiles n'était pas réduite dans le groupe IR+AT10 ($p=1$ vs. IR+Veh, NS).

Aucun effet du traitement n'était visible à 72 heures de reperfusion, le nombre de cellules infiltrées et marquées pour la myéloperoxydase était réduit dans tous les groupes ($F_{(2,12)} = 0,55$; $p=0,595$; NS) (figure 43).

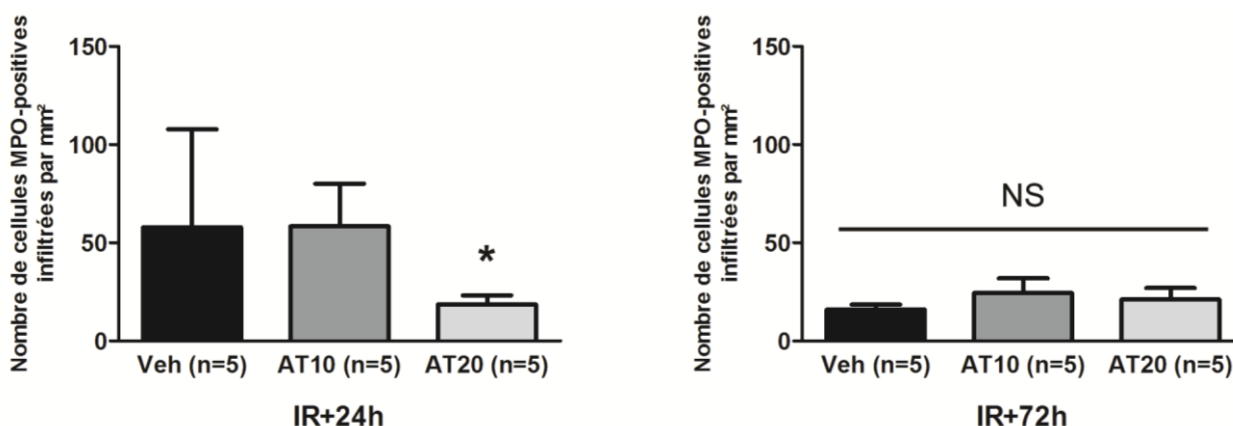


Figure 43 : Nombre moyen de cellules immunomarquées pour la myéloperoxydase et infiltrées dans la zone lésée à 24 et 72 heures de reperfusion. * $p<0,05$ vs. IR+Veh.

NB : les résultats à 24 heures de reperfusion sont présentés sous la forme « médiane + intervalle interquartile ».

III. Implication du récepteur nucléaire PPAR α dans l'effet neuroprotecteur de l'atorvastatine

A. Volume lésionnel

1. Traitement préventif

Un traitement préventif de 14 jours par atorvastatine 10 mg/kg/jour induisait une diminution significative du volume lésionnel moyen chez les souris sauvages à 24 heures de reperfusion ($t=4,26$; $p<0,001$) : $30,41 \pm 5,51$ mm³ dans le groupe AT10 contre $38,65 \pm 5,42$ mm³ dans le groupe véhicule. Le volume d'infarctus n'était pas significativement réduit chez les souris KO-PPAR α traitées par atorvastatine ($t=1,55$; $p=0,134$; NS) : $29,10 \pm 7,64$ mm³ dans le groupe traité contre $32,48 \pm 4,25$ mm³ dans le groupe véhicule (**article n°1 – figure 1**).

2. Traitement aigu

Le traitement par atorvastatine 10 mg/kg/jour induisait également une diminution du volume lésionnel lorsqu'il était débuté après ischémie-reperfusion chez les souris sauvages ($t=5,60$; $p<0,001$) : $27,19 \pm 3,61 \text{ mm}^3$ dans le groupe AT10 contre $35,59 \pm 2,54 \text{ mm}^3$ dans le groupe véhicule. Cet effet sur le volume lésionnel n'était pas présent chez les souris KO-PPAR α ($t=0,60$; $p=0,558$; NS) : $29,43 \pm 9,01 \text{ mm}^3$ dans le groupe AT10 contre $31,52 \pm 5,09 \text{ mm}^3$ dans le groupe véhicule (figure 44).

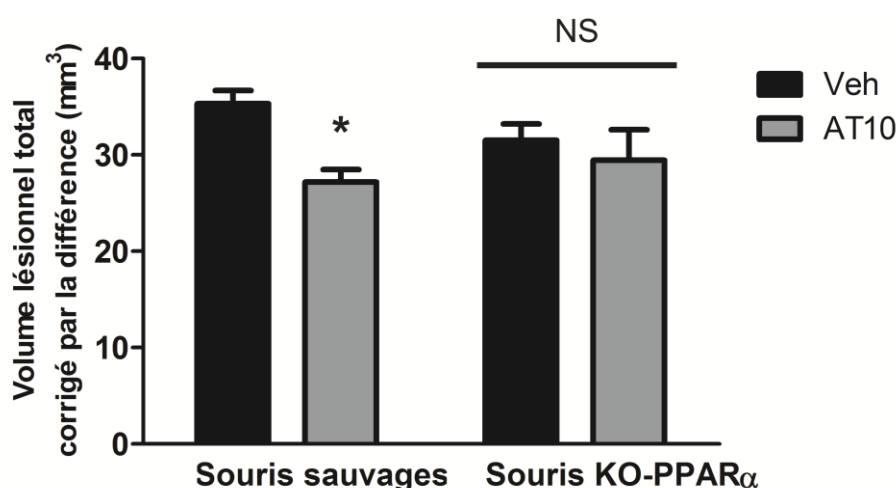


Figure 44 : Effet d'un traitement aigu par atorvastatine sur le volume lésionnel cérébral – Résultats pour les souris sauvages et les souris KO-PPAR α à 72 heures de reperfusion.

* $p<0,05$ vs. Veh. Groupes AT10 : $n=9$. Groupes Veh : $n=10$.

B. Impact vasculaire (en traitement préventif)

1. Expression des protéines d'adhésion

L'expression des protéines d'adhésion ICAM-1 et VCAM était fortement induite par l'ischémie-reperfusion. Chez les souris sauvages traitées préventivement par atorvastatine pendant 14 jours, l'expression de ces deux protéines était significativement réduite au niveau cortical et striatal : niveaux relatifs normalisés d'expression d'ICAM-1 dans la région corticale : $0,29 \pm 0,17$ ($t=10,21$; $p<0,001$), et au niveau striatal $0,14 \pm 0,07$ ($t=12,85$; $p<0,001$) ; niveaux relatifs normalisés d'expression de VCAM dans la région corticale : $0,62 \pm 0,06$ ($t=9,00$; $p<0,001$), et dans la région striatale : $0,73 \pm 0,10$ ($t=7,64$; $p<0,001$).

Chez les souris KO-PPAR α , le traitement par atorvastatine ne modifiait pas l'expression d'ICAM-1 et VCAM dans la région corticale, les niveaux relatifs normalisés d'expression étaient pour ICAM-1 de $0,91 \pm 0,37$ ($t=0,69$; $p=0,527$; NS), et pour VCAM

de $0,80 \pm 0,06$ ($t=1,15$; $p=0,228$; NS). L'effet du traitement était par contre conservé au niveau striatal : les niveaux relatifs normalisés d'expression étaient pour ICAM-1 de $0,35 \pm 0,11$ ($t=3,20$; $p=0,012$) et pour VCAM de $0,42 \pm 0,08$ ($t=3,37$; $p=0,028$) (**article n°1 – figures 3 et 4**).

2. Expression de la NOS endothéliale

Le traitement par atorvastatine entraînait une augmentation de la synthèse d'ARNm de la NOS endothéliale au niveau aortique chez les souris sauvages, de $2,5 \pm 2,25$ fois par rapport au gène de référence, contre $0,86 \pm 0,54$ fois par rapport au gène de référence chez les souris du groupe véhicule ($t= 2, 19$; $p=0,048$). Au niveau cérébral, l'expression de la NOS endothéliale tendait à être augmentée chez les souris traitées : au niveau cortical $1,29 \pm 0,50$ fois par rapport au gène de référence contre $0,89 \pm 0,54$ fois par rapport au gène de référence chez les souris du groupe véhicule ($t= 1,20$; $p= 0,259$; NS) ; et au niveau striatal $1,50 \pm 0,61$ fois par rapport au gène de référence contre $0,89 \pm 0,22$ fois par rapport au gène de référence dans le groupe véhicule ($t= 2,10$; $p= 0,076$; NS).

Chez les souris KO-PPAR α , le traitement par atorvastatine ne modifiait pas l'expression de la NOS endothéliale : au niveau aortique $0,68 \pm 0,39$ fois par rapport au gène de référence contre $0,93 \pm 0,61$ fois par rapport au gène de référence pour le groupe véhicule ($t= 0,77$; $p= 0,462$; NS) ; au niveau cortical $0,93 \pm 0,54$ fois par rapport au gène de référence contre $0,93 \pm 0,61$ fois par rapport au gène de référence pour le groupe véhicule ($t<0,001$; $p= 1$; NS) ; et au niveau striatal $0,86 \pm 0,18$ fois par rapport au gène de référence contre $0,93 \pm 0,25$ fois par rapport au gène de référence pour le groupe véhicule ($t= 0,51$; $p= 0,625$; NS) (**article n°1 – figure 6**).

ARTICLE N°1

PPAR α is involved in the multitargeted effects of a pretreatment with atorvastatin in experimental stroke.

Thavarak Ouk*, Camille Potey*, Maud Laprais, Sophie Gautier, Rémi Hanf, Raphaël Darteil, Bart Staels, Patrick Duriez, Régis Bordet

Fundamental & Clinical Pharmacology, sous presse.

ARTICLE N°2

Acute neuro- and vasculoprotective effects of atorvastatin in experimental stroke

Camille Potey, Thavarak Ouk, Olivier Pétrault, Maud Pétrault; Julia Salleron,
Régis Bordet, Sophie Gautier

En préparation pour soumission au *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*

Acute neuro- and vasculoprotective effects of atorvastatin in experimental stroke

Camille Potey¹, PharmD ; Thavarak Ouk¹, PharmD, PhD ; Olivier Pétrault, PhD ; Maud Pétrault¹ ;
Julia Salleron², Régis Bordet¹, MD, PhD ; Sophie Gautier¹, PharmD, PhD

1 - Department of Medical Pharmacology, EA 1046, IMPRT, IFR114, Faculty of Medicine,
University of Lille Nord de France; Lille University Hospital, Lille, France

2 - Department of Biostatistics, Faculty of Medicine, Lille Hospital, Lille, France

Corresponding author:

Professor R. Bordet
EA1046 – Département de Pharmacologie Médicale
1, Place de Verdun
F-59045 LILLE
E-mail : regis.bordet@univ-lille2.fr
Tel : +33 3 20 44 54 49
Fax : +33 3 20 44 68 63

Introduction

Ischemic stroke remains a heavy public health burden. Despite the improvements made in the management of stroke patients, there is still only one specific treatment efficient at the acute phase: thrombolysis with recombinant tPA. Unfortunately, only a small proportion of the eligible patients can benefit from this treatment as its use is being limited by numerous contra-indications and by a short therapeutic window, restricted to the four and a half hours following the appearance of the symptoms.

Many pharmacological strategies, although efficient in animal models, have failed to show any efficacy at the acute phase in human beings. These repeated clinical failures may be explained by the high level of complexity of the pathophysiology of stroke, insufficiently prevented by these too specific treatments. Indeed, stroke affects not only neurons but the neurogliovascular unit as a whole. Among its constituents, the blood vessel holds a particular place, being in the front line as the link between the cerebral tissue and the external environment. The endothelium plays a dual role, offering a privileged interface for beneficial and deleterious reactions to occur.

On this basis, it appears essential to develop novel pharmacological strategies that will embrace a broader spectrum and will be able to target the various pathways as well as the different cell types implicated in the pathophysiology of stroke. Pleiotropic-acting molecules could therefore be good candidates. Statins, or HMG-CoA reductase inhibitors, have been shown to be neuroprotective in stroke, in animal models as in human beings, in primary as in secondary prevention. The blood vessel, and more particularly the endothelial cells, seems to be a target of the neuroprotective effect of statins, *via* the endothelial isoform of the nitric oxide synthase, eNOS. Whether similar mechanisms are implicated, and whether other vascular-bound mechanisms are involved in the neuroprotective effect of statins when administered at the acute phase of stroke are still open questions.

Our aims in this study were (i) to confirm the neuroprotective effect of atorvastatin on a mouse stroke model at the acute phase, at the tissular level as at the functional level, and (ii) to assess the potential vasculoprotection associated to this neuroprotective effect, and to characterize the involved mechanisms.

1. Material and methods

1.1. Protocols

1.1.1. Animals and experimental design

All experiments were led in accordance with the European Union Directive 86/609/EEC and designed to minimize the number of animals. Animal care was provided according to protocols and guidelines approved by the local ethic committee (Comité d’Ethique en Expérimentation Animale du Nord-Pas-De-Calais). Male C57BL/6J mice (CERJ Janvier, Saint-Genest-en-l’Isle, France), weighing from 27 to 32 grams, housed in a temperature-controlled environment with 12-hour light/dark cycles and fed *ad libitum* with a normal diet, were used for all experiments and used for the 24-hour protocol (short protocol) and to the 7-day protocol (long protocol). In each protocol, three groups were constituted: ischemic vehicle-treated animals (IR+Veh) or treated with atorvastatin 10 or 20 mg/kg/day (IR+AT10 and IR+AT20). Animals were randomized after surgery to one of the three groups. Atorvastatin base was diluted in a vehicle solution (0.05% carboxymethylcellulose, 0.02% Tween, sterile water) and administered by oral gavage. The first administration was made extemporaneously to reperfusion (i.e. one hour after the induction of ischemia), and the second one five hours after reperfusion. Animals included in the long protocol were then treated twice a day for the next two days. Sham animals were submitted to the same treatment courses, lasting for 24 or 72 hours after surgery.

1.1.2. Inclusion and exclusion criteria

1.2. Surgical procedure

Animals were anesthetized with intraperitoneal chloral hydrate (300 mg/kg, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Transient focal cerebral ischemia was induced by intraluminal occlusion of the right middle cerebral artery as previously described [1]. Occlusion lasted for 60 minutes,

followed by a reperfusion period of 23 hours (protocol A) or 71 hours (protocol B). Sham-operated animals were submitted to the whole surgical procedure except for the introduction of the occlusive suture.

1.3. Functional assessment

Each test was performed 24 hours and 72 hours after surgery. Mice were placed in the room 30 minutes before the beginning of the tests for habituation.

1.3.1. Neurological score (adapted from [2])

The score was attributed according to the following scale : 0 = no visible deficit; 1 = flexion of torso and of left forelimb and/or deficit of extension of left forelimb when held by the tail; 2 = circles toward right when held by the tail, paws on the ground; 3 = falls on left side when walking and/or leans on left side when resting; 4 = no spontaneous locomotor activity.

1.3.2. Gripping test

The mouse being held by the tail, the forepaws were put in contact with a grid connected to an electronic device (Bioseb, Vitrolles, France) allowing the measurement of the gripping strength exerted on it by the animal.

1.3.3. Wire-hanging test

A steel wire (diameter 0.1 cm; length 50 cm) was placed horizontally 40 cm high above a foam cushion. The forepaws of the mouse were put in contact with the wire, then the animal was released. The latency to fall from the wire was recorded, with a maximum of 60 seconds.

Mice were naïve to the two latter tests.

1.3.4. Adhesive removal test (adapted from [3])

Mice were placed for a 60 second habituation period in a plexiglas tub. A piece of adhesive tape (0.4x0.4 cm², 3M, Cergy-Pontoise, France) was gently applied to cover the palm of each forepaw. The order of placement (left or right paw first) was alternated at every trial. The animal was then placed back in the tub, and the times to detect and remove the tapes were measured with a maximum of 120 seconds. Mice were trained every day for 4 days before surgery (5 trials per session per mouse), to limit the impact of inter-individual variations. At the end of the training period, the animals that could not take off both tapes within 10 seconds were excluded from the study.

1.4. Sacrifice and tissue preparation

Animals were sacrificed 24 hours (short protocol) or 72 hours (long protocol) after MCAO, with an overdose of pentobarbital (200 mg/kg, ip). For the ex-vivo vascular reactivity study, brains were quickly harvested and the right MCA excised. Brains were then frozen in isopentane and cut later for infarct confirmation. No quantification was made on these unprocessed tissues. For the molecular biology study, brains were quickly removed, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For histological studies, animals were perfused intracardially with heparinized saline solution and paraformaldehyde (PFA) 4%. Brains were removed and kept overnight at 4°C successively in PFA and sucrose 30%, and finally frozen by immersion in isopentane stored at -30°C.

1.5. Assessment of ex-vivo vascular reactivity

1.5.1. Protocol

The brains were immersed in a cold saline physiological solution ($[\text{NaCl}] = 119 \text{ mM}$, $[\text{NaHCO}_3] = 24 \text{ mM}$; $[\text{KCl}] = 4,7 \text{ mM}$; $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1,18 \text{ mM}$; $[\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}] = 1,17 \text{ mM}$; $[\text{glucose}] = 10 \text{ mM}$; $[\text{CaCl}_2] = 1,6 \text{ mM}$; $\text{pH} = 7,4$), oxygenated with a mixture 20% O₂, 5% CO₂ and 75% N₂. The right MCA was removed and mounted between two glass cannulas in a Halpern's arteriograph

(CH/2/A, Living System Instrumentation, St. Albans, United States). The saline physiological solution is slowly heated to 37°C, and the artery is left to stabilize for 1 hour at an intraluminal pressure of 20 mmHg. After precontraction with a single dose of phenylephrine (Phe, 10^{-4} M), the endothelium-dependent relaxation is assessed by submitting the artery to increasing concentrations of carbamoylcholine, (carbachol or CCh) from 10^{-9} M to 10^{-4} M (Sigma-Aldrich, Saint-Genest-en-l'Isle, France). The implication of the endothelial nitric oxide production is assessed with the NOS-3 competitive antagonist N^ω-Nitro-L-Arginin 10^{-4} M (L-NNA, Sigma-Aldrich, Saint-Genest-en-l'Isle, France). The viability of the artery is assessed with sodium nitroprusside (SNP) 10^{-4} M (Sigma-Aldrich, Saint-Genest-en-l'Isle, France).

1.5.2. Data quantification

The effect of CCh on the MCA is expressed as the increase in diameter after precontraction with Phe in response to the increase in CCh concentration, and presented as a dose-response curve. The artery response is expressed as the percentage of increase in diameter (Ø):

$$\% \text{ response} = [(\text{ØCCh} / \text{ØPhe}) - 1] \times 100$$

The percentage of maximal diameter increase induced by CCh is calculated by:

$$\% \text{ response} = [(\text{ØCCh} - \text{ØPhe}) / (\text{Ø baseline} - \text{ØPhe})] \times 100$$

Data is also presented as a percentage of the maximal effect to determine the effective concentrations 50 (EC50). A sigmoid mathematic modelisation was performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, United States).

The percentage of diameter increase in response to SNP is calculated by:

$$\% \text{ response} = [(\text{ØSNP} - \text{ØPhe}) / (\text{Ø baseline} - \text{ØPhe})] \times 100$$

The percentage of diameter increase related to endothelial NO release is calculated by :

$$\% \text{ response} = [(\text{ØL-NNA} - \text{ØPhe}) / (\text{ØCCh maximal} - \text{ØPhe})] \times 100$$

1.6. Histology and immunohistochemistry for vascular targets

1.6.1. Infarct volume quantification

20- μ m thick cryostat-cut slices were stained with cresyl violet. After digitization, the infarct volume was quantified by calculating the numerical integration of the infarcted areas using the software ImageJ (Image J v.1.47a, NIH, Bethesda, MD). Infarct volumes are corrected to compensate for the oedema, according to the following formula: corrected infarct volume = measured infarct volume x (volume of left hemisphere/volume of right hemisphere) [4][5].

1.6.2. Immunohistochemistry – colorimetric method

The endothelial adhesion protein ICAM-1 and the enzyme myeloperoxidase, specific for polymorphonuclear cells, are studied with this method. After a step of inhibition of endogenous peroxidases (30 minutes in methanol, H₂O₂, PBS), non specific interaction sites were blocked with goat or rabbit serum 10% (depending on the species producing the secondary antibody) for 1 hour. Slices were next left in contact with the primary antibody overnight at 4°C: anti-myeloperoxidase, 1/500 (DAKO, Courtaboeuf, France) ; anti-ICAM-1, 1/200 (Proteintech, Manchester, UK), and then incubated for 3 hours with the secondary antibody at room temperature: anti-rabbit or anti-goat polyclonal antibody, 1/200 (Vector, Burlingame, CA). The staining was revealed by DAB/H₂O₂ exposure according to the manufacturer's instructions (Fast DAB Tablets Set, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

1.6.3. Immunofluorescence

Type IV-collagen is a major constituent of the basal lamina of cerebral blood vessels. After a simultaneous step of non specific interaction sites blockade and of permeabilization with horse serum 10% and 0,3% Triton X-100 in KPBS, the slices were incubated overnight with the primary antibodies at 4°C: anti-eNOS, 1/200, anti-VWF, 1/200, anti-type IV collagen, 1/200 (Abcam,

Cambridge, UK), then with the corresponding secondary antibodies: Alexa Fluor anti-rabbit and anti-sheep polyclonal antibodies, 1/500 (Invitrogen, Cergy, France) for an hour and mounted with Vectashield DAPI (Vector, Burlingame, CA). The fluorescence intensities were read on a confocal microscope (LSM710, Zeiss, Le Pecq, France).

1.6.4. Semi-quantitative analysis

For ICAM-1 and MPO, the number of respectively immunomarked vessels and cells were counted on three successive slices in four predetermined areas of 1 mm² located in the ischemic zone, including cortex and striatum.

For type IV collagen, images were acquired with the software ZEN 2010 (Zeiss, Le Pecq, France) keeping the same parameters for each acquisition: laser power 8.00, gain 739, digital offset -11, digital gain 1.0, bit depth 16 bits, objective 20x, averaging 4, speed 7, resolution 512x512. The scanned area was 2125.48 µm long and 1700.38 µm wide, and the final image was obtained combining a z-stack to a tile scan. Images were processed to obtain the maximum intensity projection image. The slice was reconstructed in ImageJ from the z-stack images, converted to a gray level image and the mean gray level was measured. The mean area occupied by fluorescence is measured on the maximum intensity projection images, keeping the same threshold (set to 25) for each measurement.

For these three analyses, the evaluator was blinded to the treatment status of the evaluated animals (5 per group).

1.7. Assessment of vascular permeability

Mice were injected intravenously with 200 µl of a solution of FITC-Dextran (70kDa, 50 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Sain-Quentin Fallavier, France). After 2 minutes, mice were decapitated. Brains

were post-fixed in 4% PFA and sucrose 30% for 24 hours at 4°C, and frozen in isopentane at -30°C. 20 µm slices were cryostat-cut and mounted with Vectashield with DAPI (Vector, Burlingame, CA) for visualization of the tissular extravasation of FITC-Dextran.

1.8. Analysis of the cerebral expression of ICAM-1 and NOS-3

1.8.1. Brain microvessels isolation

After injection of an overdose of pentobarbital, mice were shortly perfused intracardially with cold heparinized serum. Brains were quickly removed, hemispheres separated and immediately deep frozen in liquid nitrogen. Hemispheres were later gently grinded with a Dounce homogenizer in ice-cold PBS and treated according to the method previously described by Guo et al. [5]. The cerebral vessels collected were stored at -80°C.

1.8.2. rtPCR

Brain vessel fractions from 6 animals per group were homogenized in Extract-All buffer (Eurobio, Courtaboeuf, France) with a mechanical grinder, and total RNA was extracted from samples according to the manufacturer protocol. Total RNA was quantified by spectrophotometry ($\lambda=260$ nm). The remaining contaminating DNA was digested with DNase I (Roche Applied Science, Meylan, France) for 30 minutes at 37 °C.

1 µg of RNA was used per sample for reverse transcription performed under standard conditions with the reverse transcriptase Superscript III (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and random hexamer primers (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France) in a 25 µL final volume. The RT products, i.e. cDNA, were next diluted up to 100 µL in sterile water.

Quantitative PCR was performed using a Light Cycler system (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. Reactions were performed in 10 µl with 1 µl cDNA, 0.5 µ mol/L primers, and 1

µl of Light Cycler-FastStart DNA Master SYBR Green 1 mix (Roche Applied Science). To confirm amplification specificity, PCR products were subjected to a melting curve analysis. Quantification data represent the mean of two experiments. TBP (TATA-Box Binding Protein) was selected among other housekeeping genes for normalization in real-time PCR analysis. The sequences of the primers used for each of the gene are detailed in table 1.

1.9. Statistical analysis

All tests were performed using SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Results are expressed as median; mean $\pm$ SD. The threshold for statistical significance is set to $p < 0.05$. Means are compared with one-way ANOVA or a Kruskal-Wallis test if data are not normally distributed. The data obtained from the functional tests were compared by repeated measures ANOVA. If significance is reached, differences between groups are evaluated with a post-hoc analysis, using Bonferroni corrected post hoc tests following ANOVA, or the Mann-Whitney U test following a non parametric analysis.

2. Results

2.1. Atorvastatin is neuroprotective when administered after stroke

Acute treatment with atorvastatin was responsible for a significant decrease in infarct volume in mice treated at 20 mg/kg/d 24 hours after ischemia-reperfusion, as well as in edema volume (table 2). This beneficial effect was still present after 72 hours of reperfusion. Interestingly, this was associated to an amelioration of the neurological status of IR+AT20 mice, as evaluated by the neurological score (group, $F_{(2,41)} = 6.18$, $p < 0.05$; IR+Veh vs. IR+AT20, $p = 0.007$; IR+AT10 vs. IR+AT20, $p = 0.016$). This positive effect was also seen in the three functional tests performed (figure 1) at the two time points. Mortality tended to decrease in the IR+AT20 at 72 hours: 48,44% of the IR+Veh animals died before 72 hours, against 43,94% in the IR+AT10 group and 26,67% in

the IR+AT20 group ($\chi^2=5,514$; $p=0,063$). The neuroprotective effect of the daily dose 10 mg/kg was weak with no significant functional impact. In sham-operated mice, the atorvastatin treatment had no effect (see supplementary data for details).

In the statistical analysis based on repeated measures ANOVA, there was no interaction between time and treatment, i.e. the three groups had comparable progression (time x treatment, NS). The effect of time was on the other hand significant in each test ($p<0.05$) (see supplementary data for details).

2.2. Atorvastatin is vasculoprotective when administered after stroke

2.2.1. Atorvastatin preserves the endothelial function from acute stroke injury

After 72 hours of reperfusion, the acute atorvastatin treatment did not modify the endothelium-dependent relaxation in response to a cholinergic stimulation in sham animals (figure 2 panel B). There were no differences in the observed maximal responses (table 3). Ischemia-reperfusion induced a marked endothelial dysfunction (figure 2 panel B). The maximal response to CCh was reduced in IR+Veh animals compared to sham+Veh animals (table 3 - $t=8,38$; $p<0,001$). Treatment with atorvastatin tended to preserve the endothelial function in IR animals (table 4) and to ameliorate the maximal response to CCh ($F_{(2,11)} = 3,89$; $p=0,061$; NS). Although atorvastatin did not modify the sensitivity to CCh in sham-operated animals ($F_{(1,91)} = 0,15$; $p=0,701$; NS) (figure 2 panel C), it counteracted the loss of sensitivity induced by ischemia-reperfusion as evidenced by the EC50 evaluated in the six groups ($F_{(2,123)} = 4,89$; $p=0,009$) (table 5).

The relaxation induced by SNP confirmed that the dysfunction we evidenced is endothelium-dependent. This response was not modified by atorvastatin, neither in sham-operated animals (table 6 - $t=0,779$; $p=0,492$; NS) nor in the IR groups (table 7 - $F_{(2,11)} = 0,618$; $p=0,560$; NS). The endothelial NO release was not modified by atorvastatin (table 8).

2.2.2. The vasculoprotection is characterized by a preservation of blood vessel integrity

The semi-quantitative analysis of the immunofluorescent staining for type IV-collagen revealed that 24 hours after experimental stroke there were no differences in the mean stained area or in the mean fluorescent intensity. After 72 hours of reperfusion, IR+AT20 mice exhibited a higher proportion of stained blood vessels, which was associated to a more intense fluorescence intensity measured on these slices (figure 3, panels A to D).

2.2.3. The vasculoprotection is related to a decrease in leukocyte-endothelium interactions

Meanwhile, the semi-quantitative analysis of the immunohistochemical staining for the granulocyte-specific enzyme myeloperoxidase revealed that the number of positive infiltrated cells in the brain parenchyma was also reduced in IR+AT20 mice at the same time point (figure 4 panels x and x). After 72 hours, there was no difference left for these two parameters.

3. Discussion

In this study, we confirmed that a post-ischemic treatment with atorvastatin is responsible for a reduction in cerebral infarct volumes as in edema. This neuroprotective effect is associated to a significant amelioration of functional recovery for the animals treated at 20 mg/kg/d: the neurological deficit was reduced and the sensory-motor recovery was improved. This daily dose of atorvastatin also tends to decrease mortality. Next to this global neuroprotective effect, we evidence the vasculoprotective properties of an acute atorvastatine treatment. After 72 hours of reperfusion, the endothelial function of the right MCA, occluded in our model, is preserved. The sensitivity to cholinergic stimulation is maintained, and there is a tendency toward a preservation of the relaxation capacity of the artery. This beneficial effect seems independent from the endothelial production of nitric oxide. At the microvascular level, the microvessel density increases 72 hours after ischemia-reperfusion, and their integrity is preserved. The endothelial adhesion and the parenchymal infiltration of leukocytes, especially granulocytes, is dramatically reduced in atorvastatin-treated animals after 24 hours of reperfusion.

We assessed the functional recovery during the first 72 hours following MCAO. We did not perform any cognitive assessment as the surgical procedure affects the mobility and the reactivity of mice to external stimuli, and the resulting motor impairment is likely to interfere with the tests. The neurological score adapted from Bederson (1986), the grip test and the hanging wire test give a rough evaluation of motor function. The adhesive removal test, on the contrary, gives a precise and thorough evaluation of the evolution of the sensorymotor deficit [6]. In the literature, there is still few data on the functional impact of statins in the first hours following experimental cerebral ischemia. Treatment initiation within hours after MCAO seems to reduce the neurological deficit evaluated 24 hours later [7,8]. Even a unique administration of rosuvastatin seems effective, as it was shown to reduce the mean lesion volume, the neurological deficit, and to improve the results in the hanging wire test and the pole test [9]. The functional impact of a statin treatment started 24 hours after MCAO for 7 or 14 days has been more evaluated. In this dose schedule, statins do not seem to modify lesion volumes anymore, but still improve functional recovery [10–13].

Statin treatment in cerebral exert pleiotropic effects, responsible for the neuroprotective effects discussed above, but also responsible for vasculoprotection. Here, we show that this vasculoprotection embraces endothelial protection as well as structural protection. It is long known that blood vessels are a target of statins, thanks to a positive impact on endothelial NO synthase

which appears as an augmentation of cerebral blood flow (CBF) in treated animals [14–17]. This hemodynamic impact is underlain by an impact on the endothelial function. In spontaneously hypertensive rats (SHR), a long-term treatment with statins improved the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in large arteries [18–20]. Ischemia-reperfusion significantly alters the endothelial function of the MCA [21]. In mice given a 14 day-treatment with simvastatine before MCAO, CBF was maintained and the aortic endothelial function preserved after 24 hours of reperfusion [22]. We show here for the first time a protection of the MCA against post-ischemic endothelial dysfunction by atorvastatin when administered after MCAO.

We also show that atorvastatin was also protective to microvessels. The integrity and the density were preserved, even increased in treated animals. It has already been shown that a 4 week-preventive treatment with pravastatin and atorvastatin was associated to a decrease in the disruption of the basal lamina of brain microvessels, objectified by a decrease in type IV-collagen loss and hemoglobin extravasation, after 24 hours of reperfusion [23,24]. A single post-stroke administration of atorvastatin after embolic MCAO had no effect on the collagenic loss [25].

Statins also participate to microvascular protection by modulating the interactions between leukocytes and the vascular wall. By their anti-inflammatory action, they limit the production of pro-inflammatory cytokines and chemoattractants [20,26,27]. They also limit the expression of adhesion molecules induced after ischemia-reperfusion [28], and of the corresponding integrins on leukocytes [29], and so contribute to the reduction of leukocyte infiltration [30]. Only one study shows a reduction of the expression of ICAM-1 after 24 hours by a statin post-stroke treatment, after a unique dose of atorvastatin [25]. Similar effects were evidenced in a rat model of traumatic brain injury with an acute simvastatine treatment: ICAM-1 expression and granulocyte extravasation were reduced [31].

Conclusion: statins, potential future disease-modifier agents?

4. Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Jean-Christophe Devedjian and Pr Vincent Bérézowski for their useful advice on the molecular biology experiments and on the vascular integrity assays, the team of the Cellular Imaging platform and especially Meryem Tardivel for her precious help with confocal microscopy, and Pr Shobu Namura for his guidance on the cerebral blood vessels separation procedure.

5. References

- [1] Descamps E, Petrault-Laprais M, Maurois P, Pages N, Bac P, Bordet R, et al. Experimental stroke protection induced by 4-hydroxybenzyl alcohol is cancelled by bacitracin. *Neurosci Res.* 2009;64:137–42.
- [2] 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.
- [3] Bouet V, Boulouard M, Toutain J, Divoux D, Bernaudin M, Schumann-Bard P, et al. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat Protoc.* 2009;4:1560–4.
- [4] Bordet R, Deplanque D, Maboudou P, Puisieux F, Pu Q, Robin E, 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.
- [5] Guo Q, Wang G, Namura S. Fenofibrate improves cerebral blood flow after middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30:70–8.
- [6] Bouët V, Freret T, Toutain J, Divoux D, Boulouard M, Schumann-Bard P. Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp Neurol.* 2007;203:555–67.
- [7] Céspedes-Rubio A, Jurado F, Cardona-Gómez G. p120 catenin/ α N-catenin are molecular targets in the neuroprotection and neuronal plasticity mediated by atorvastatin after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2010;88:3621–34.
- [8] Cui L, Zhang X, Yang R, Wang L, Liu L, Li M, et al. Neuroprotection of early and short-time applying atorvastatin in the acute phase of cerebral ischemia: Down-regulated 12/15-LOX, p38MAPK and cPLA2 expression, ameliorated BBB permeability. *Brain Res.* 2010;1325:164–73.
- [9] Prinz V, Laufs U, Gertz K, Kronenberg G, Balkaya M, Leithner C, et al. Intravenous Rosuvastatin for Acute Stroke Treatment: An Animal Study. *Stroke.* 2008;39:433–8.
- [10] Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, et al. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol.* 2003;53:743–51.
- [11] Chen J, Zhang C, Jiang H, Li Y, Zhang L, Robin A, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25:281–90.
- [12] Chen J, Zacharek A, Li A, Zhang C, Ding J, Roberts C, et al. Vascular endothelial growth factor mediates atorvastatin-induced mammalian achaete-scute homologue-1 gene expression and neuronal differentiation after stroke in retired breeder rats. *Neuroscience.* 2006;141:737–44.
- [13] Shehadah A, Chen J, Cui X, Roberts C, Lu M, Chopp M. Combination treatment of experimental stroke with Niaspan and Simvastatin, reduces axonal damage and improves functional outcome. *J Neurol Sci.* 2010;294:107–11.

- [14] Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, et al. 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.
- [15] Yamada M, Huang Z, Dalkara T, Endres M, Laufs U, Waeber C, et al. Endothelial nitric oxide synthase-dependent cerebral blood flow augmentation by L-arginine after chronic statin treatment. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:709–17.
- [16] Berger C, Xia F, Maurer M, Schwab S. Neuroprotection by pravastatin in acute ischemic stroke in rats. *Brain Res Rev.* 2008;58:48–56.
- [17] Amin-Hanjani S, Stagliano NE, Yamada M, Huang PL, Liao JK, Moskowitz MA. Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. *Stroke.* 2001;32:980–6.
- [18] Suh J, Choi D, Chang H, Cho Y, Youn T, Chae I, et al. HMG-CoA Reductase Inhibitor Improves Endothelial Dysfunction in Spontaneous Hypertensive Rats Via Down-regulation of Caveolin-1 and Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *J Kor Med Sci.* 2010;25:16–23.
- [19] Kansui Y, Fujii K, Goto K, Abe I, Iida M. Effects of fluvastatin on endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-mediated relaxations in arteries of hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31:354–9.
- [20] Gelosa P, Ballerio R, Banfi C, Nobili E, Gianella A, Pignieri A, et al. Terutroban, a Thromboxane/Prostaglandin Endoperoxide Receptor Antagonist, Increases Survival in Stroke-Prone Rats by Preventing Systemic Inflammation and Endothelial Dysfunction: Comparison with Aspirin and Rosuvastatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;334:199–205.
- [21] 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.
- [22] Kim H, Sawada N, Soydan G, Lee H, Zhou Z, Hwang S, et al. Additive effects of statin and dipyridamole on cerebral blood flow and stroke protection. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:1285–93.
- [23] Trinkl A, Vosko M, Wunderlich N, Dichgans M, Hamann G. Pravastatin reduces microvascular basal lamina damage following focal cerebral ischemia and reperfusion. *Eur J Neurosci.* 2006;24:520–6.
- [24] Kawai H, Deguchi S, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Omote Y, et al. Protection against ischemic stroke damage by synergistic treatment with amlodipine plus atorvastatin in Zucker metabolic rat. *Brain Res.* 2011;1382:308–14.
- [25] Zhang L, Zhang Z, Ding G, Jiang Q, Liu X, Meng H, et al. Multitargeted Effects of Statin-Enhanced Thrombolytic Therapy for Stroke With Recombinant Human Tissue-Type Plasminogen Activator in the Rat. *Circulation.* 2005;112:3486–94.

- [26] Kawai H, Deguchi S, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Shang J, et al. Synergistic benefit of combined amlodipine plus atorvastatin on neuronal damage after stroke in Zucker metabolic rat. *Brain Res.* 2011;1368:317–23.
- [27] Sironi L, Banfi C, Brioschi M, Gelosa P, Guerrini U, Nobili E, et al. Activation of NF- κ B and ERK1/2 after permanent focal ischemia is abolished by simvastatin treatment. *Neurobiol Dis.* 2006;22:445–51.
- [28] Mayanagi K, Katakam PV, Gáspár T, Domoki F, Busija DW. Acute treatment with rosuvastatin protects insulin resistant (C57BL/6J ob/ob) mice against transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:1927–35.
- [29] Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nature Med.* 2001;7:687–92.
- [30] Kawashima S, Yamashita T, Miwa Y, Ozaki M, Namiki M, Hirase T, et al. HMG-CoA Reductase Inhibitor Has Protective Effects Against Stroke Events in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Stroke.* 2003;34:157–63.
- [31] Béziaud T, Ru Chen X, El Shafey N, Fréchou M, Teng F, Palmier B, et al. Simvastatin in traumatic brain injury: Effect on brain edema mechanisms. *Crit Care Med.* 2011;39:2300–7.

6. Figure captions

Figure 1

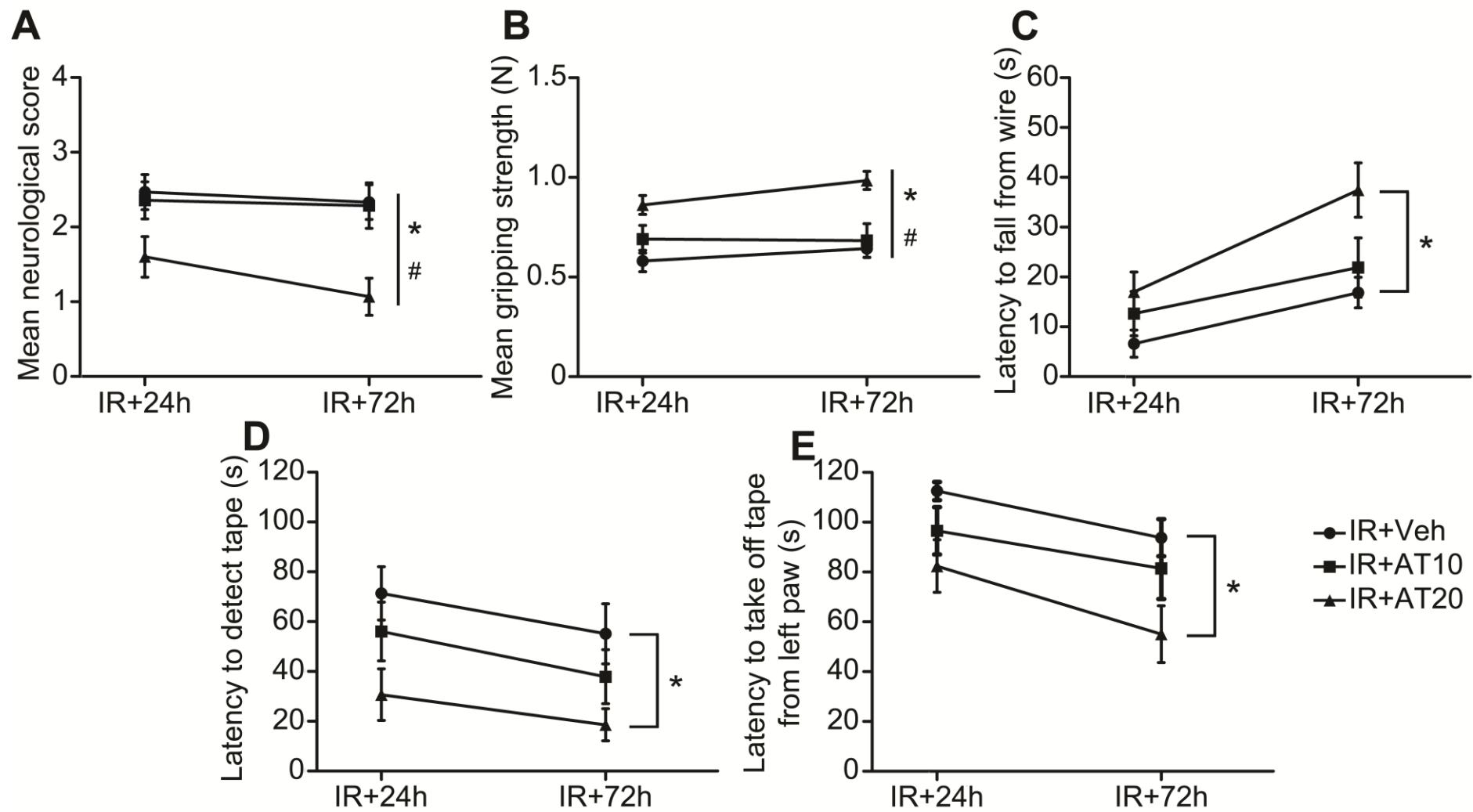
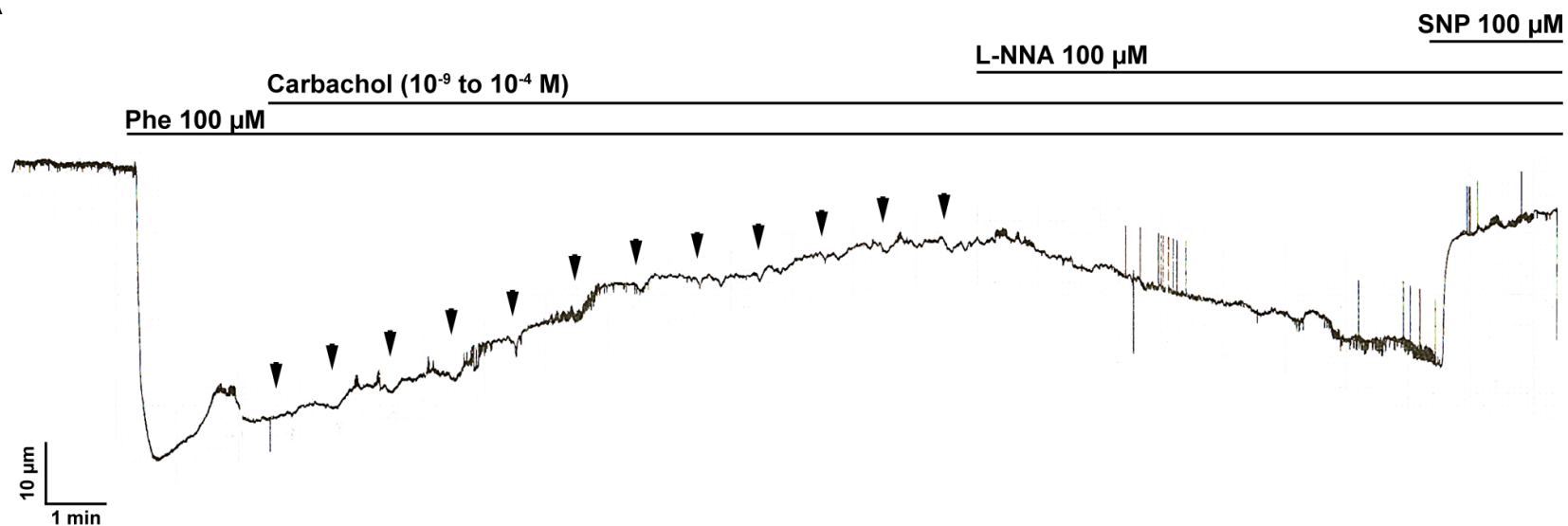
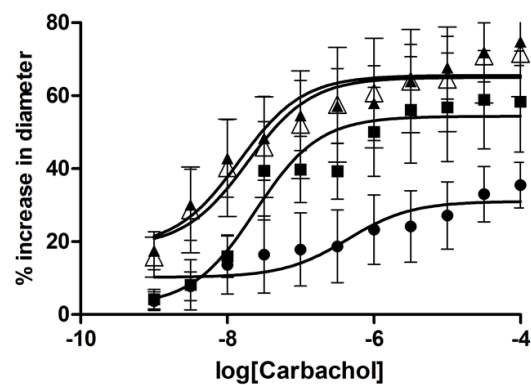
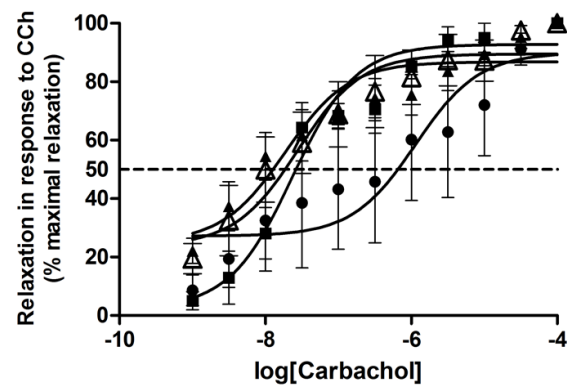


Figure 2

A**B****C****D**

Données en cours
d'acquisition

Complément de données en cours

Figure 3

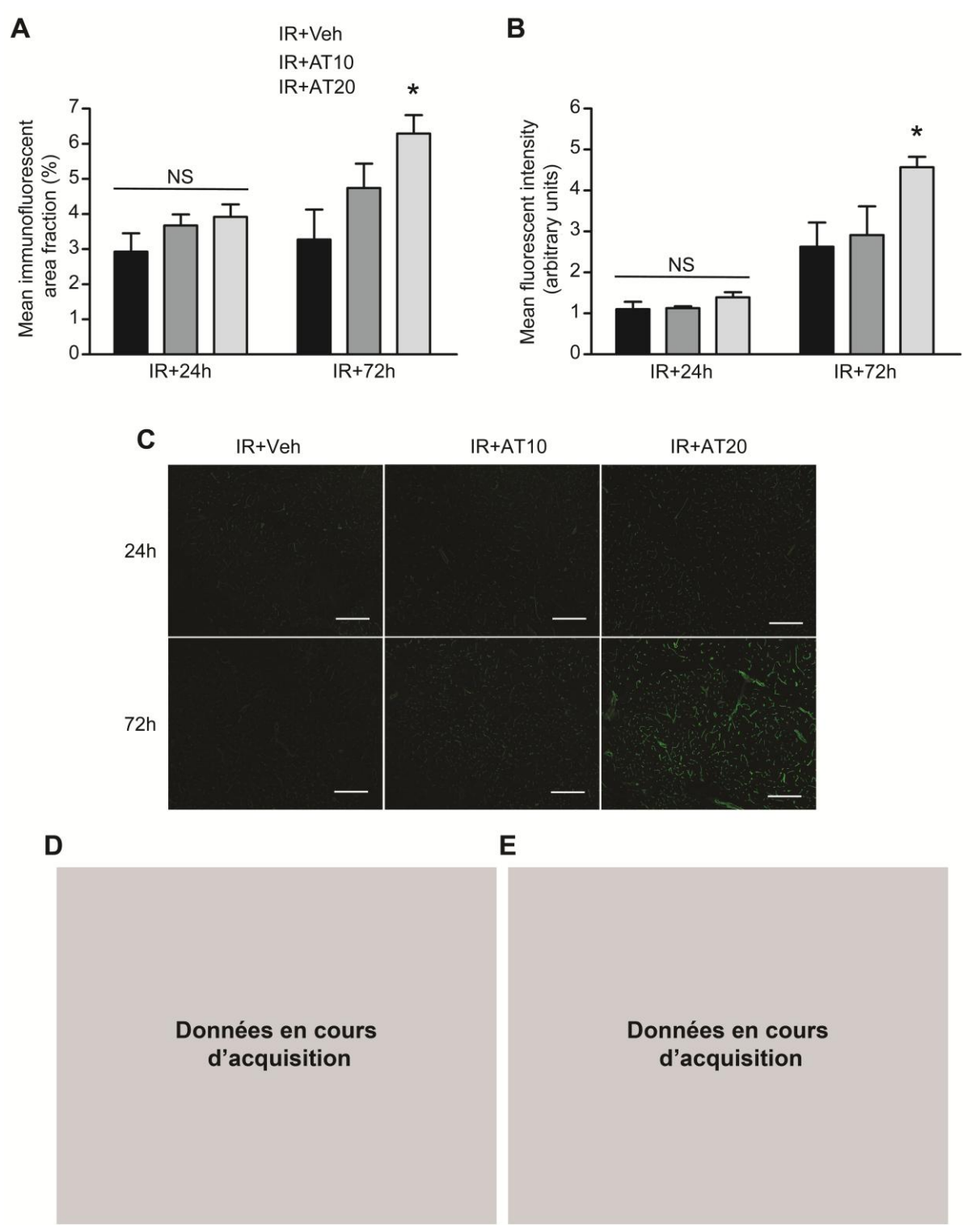
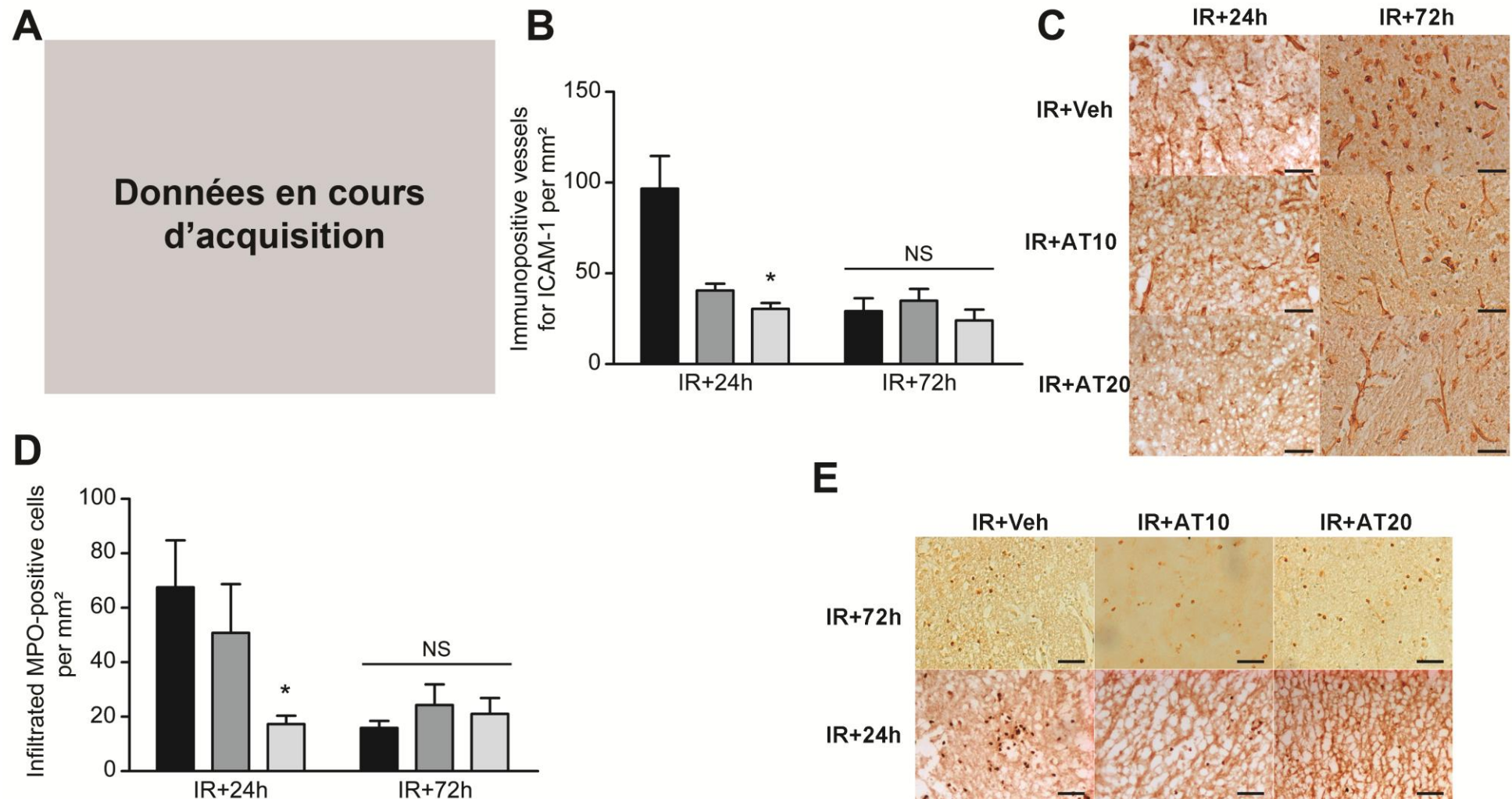


Figure 4



Tables

Table 1 :

Gene	Primers
TATA-Box Binding Protein (TBP)	Up 5'-GGCGGTTTGGCTAGGTTT-3' Lo 5'-GGGTTATCTTCACACACCATGA-3'
ICAM-1	Up 5'-GGCCACCATCCTGTTCTG-3' Lo 5'-TGGTAGACAGCATTACCTCA-3'
Endothelial NO-synthase	Up 5'-ATCCAGTGCCCTGCTTCA-3' Lo 5'-GCAGGGCAAGTTAGGATCAG-3'

Table 2:

Time point	Treatment group	Group size	Total infarct volume (mm ³)	Cortical infarct volume (mm ³)	Striatal infarct volume (mm ³)	Edema (mm ³)
24 hours	IR+Veh	8	33.26 +/- 4.44	27.17 +/- 4.15	6.07 +/- 1.55	18.52 +/- 3.35
	IR+AT10	9	31.65 +/- 2.59	26.75 +/- 2.18	4.90 +/- 0.69	13.62 +/- 4.53*
	IR+AT20	9	25.03 +/- 6.70*#	21.16 +/- 5.73*#	3.87 +/- 1.38*	8.98 +/- 2.92*#
72 hours	IR+Veh	10	37.60 +/- 7.28	31.17 +/- 5.10	6.43 +/- 2.44	15.67 +/- 6.13
	IR+AT10	9	36.66 +/- 6.87	1.24 +/- 5.74	5.42 +/- 1.50	13.42 +/- 3.94
	IR+AT20	10	26.81 +/- 9.46*#	22.57 +/- 7.76*#	4.24 +/- 2.45	7.65 +/- 6.15*

Table 3:

Diameter (μm)	Sham+Veh		Sham+AT10		Sham+AT20	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h
Baseline		109 +/- 3		120		112 +/- 7
[Phe] = 10^{-4} M		71 +/- 6		87		74 +/- 9
[CCh] = 10^{-4} M		104,62 +/- 12,28		106		102,25 +/- 12,50
% response		97,29 +/- 1,99		84,85		87,76 +/- 13,98

Table 4:

Diameter (μm)	IR+Veh		IR+AT10		IR+AT20	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h
Baseline		105 +/- 12		107 +/- 11		106 +/- 5
[Phe] = 10^{-4} M		56 +/- 8		78 +/- 11		85 +/- 4
[CCh] = 10^{-4} M		73 +/- 17,70		92,25 +/- 26,65		100,60 +/- 10,16
% response		35,47 +/- 6,21 %		58,39 +/- 13,82 %		74,84 +/- 6,51 %

Table 5:

EC50 (μM)	Veh		AT10		AT20	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h
Sham		19,43 +/- 11,10		38,69 +/- 23,10		27,98 +/- 18,50
IR		1145 +/- 970		23,65 +/- 10,50		18,73 +/- 11,20

Table 6:

Diameter (μm)	Sham+Veh		Sham+AT10		Sham+AT20	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h
[SNP] = 10^{-4} M		108 +/- 3		115		108 +/- 5
% response		97,29 +/- 0,73 %		84,85 %		87,76 +/- 12,21 %

Table 7:

Diameter (μm)	IR+Veh		IR+AT10		IR+AT20	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h
[SNP] = 10^{-4} M		100 +/- 14		98 +/- 11		103 +/- 4
% response		87,16 +/- 6,82 %		73,22 +/- 14,63 %		85,35 +/- 4,37 %

Table 8:

Diameter (μm)	Veh		AT10		AT20	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h
Sham		68,01 +/- 7,13 %		42,11 %		39,37 +/- 21,03 %
IR		- 8,58 +/- 24,75 %		13,60 +/- 40,62 %		49,82 +/- 19,18 %

Figure legends

Figure 1: The post-ischemic treatment with atorvastatin improves functional recovery. **A:** The neurological deficit was reduced in AT20-treated mice, as evidenced by the decrease in the neurological score ($F_{(1,41)} = 6,18$; $p=0,004$). **B:** The gripping strength exerted by the upper limbs was higher in AT20-treated mice ($F_{(1,41)} = 9,16$; $p<0,001$). **C:** AT20-treated mice spent a longer time hanging to the wire ($F_{(1,41)} = 4,15$; $p=0,023$). **D and E:** AT20-treated mice detected faster the pieces of adhesive tape stuck to the upper limbs forepaws ($F_{(1,41)} = 4,21$; $p=0,022$), and removed the piece on the left paw (contralateral side to the ischemic lesion) faster ($F_{(1,41)} = 3,90$; $p=0,028$).

Figure 2: The post-ischemic treatment with atorvastatin preserves the endothelial function of the MCA. **A:** Example of a recording for a mouse of the IR+AT20 group after 72 hours of reperfusion, and corresponding steps of the protocol. **B:** Dose response curves to carbamoylcholine. Atorvastatin tended to preserve the relaxation capacity of the artery after 72 hours. **C:** EC50 to carbamoylcholine. Atorvastatin preserved the sensitivity to cholinergic stimulation in treated mice after 72 hours of reperfusion. **D:** Endothelial NO synthase expression in the vasculature evaluated by rtPCR.

Figure 3: Atorvastatin preserves the cerebral microvasculature. **A:** Area fraction occupied by the fluorescent staining for type IV collagen. The microvascular density was significantly higher in IR+AT20 mice after 72 hours of reperfusion ($F_{(2,12)} = 4,61$; $p=0,033$). **B:** Mean fluorescence intensities for the type IV collagen staining. The fluorescence intensity was higher in the IR+AT20 group after 72 hours ($F_{(2,12)} = 3,80$; $p=0,050$). **C:** Examples of staining for type IV collagen in the three groups at 24 and 72 hours of reperfusion (bar = 100 μ m). **D:** Extravasation of 70 kDa dextran-FITC after 24 hours of reperfusion. **E:** Extravasation of 70 kDa dextran-FITC after 72 hours of reperfusion.

Figure 4: The interactions between leukocytes and the vascular wall are reduced in atorvastatin-treated animals. **A:** Expression of the adhesion molecule ICAM-1 in the vasculature evaluated by rtPCR. **B:** Semi-quantitative analysis of the immunohistochemical staining for ICAM-1. The staining was significantly lower in treated mice after 24 hours of reperfusion ($H=9,40$; $p=0,009$). **C:** Examples of staining for ICAM-1 after 24 and 72 hours of reperfusion (bar = 50 μ m). **D:** Semi-quantitative analysis of the immunohistochemical staining for the granulocytic enzyme myeloperoxidase. The number of parenchymal granulocytes was significantly lower in AT20-treated mice after 24 hours of reperfusion ($H=6,03$; $p=0,049$). **E:** Examples of staining for myeloperoxidase after 24 and 72 hours of reperfusion (bar = 100 μ m).

Table legends

Table 1: Primers used for the rtPCR experiments.

Table 2: Atorvastatin is neuroprotective when administered after stroke, treated mice exhibited smaller lesions. Volumes were compared by one-way ANOVA, followed by corrected Bonferroni post-hoc tests if significance is reached. * $p < 0.05$ vs. IR+Veh. # $p < 0.05$ vs. IR+AT10

Table 3: Mean diameters and maximal responses of isolated MCAs to carbamoylcholine in sham-operated animals.

Table 4: Mean diameters and maximal responses of isolated MCAs to carbamoylcholine in animals submitted to ischemia-reperfusion.

Table 5 : Mean values of the EC 50.

Table 6: SNP-induced relaxation in sham-operated animals.

Table 7: SNP-induced relaxation in animals submitted to ischemia-reperfusion.

Table 8: Part of the maximal relaxation to carbamoylcholine attributable to the NO endothelial production

Supplementary data

Detailed results of the functional tests. All results are presented as mean +/- standard deviation.

	IR+Veh		IR+AT10		IR+AT20	
Group size	15		14		15	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h
Neurological score	2.47 +/-0.95	2.33 +/- 0.90	2.36 +/- 0.93	2.29 +/- 1.14	1.60 +/- 1.05	1.07 +/- 0.96
Grip test (N)	0.58 +/- 0.21	0.65 +/- 0.18	0.69 +/- 0.17	0.68 +/- 0.16	0.86 +/- 0.17	0.98 +/- 0.18
Hanging wire test (s)	6.64 +/- 10.52	16.89 +/- 11.88	12.67 +/- 16.64	21.93 +/- 22.20	17.02 +/- 15.55	37.49 +/- 21.14
Adhesive removal test Detection (s)	71.33 +/- 41.38	55.13 +/- 46.74	56.03 +/- 44.21	37.88 +/- 40.60	30.69 +/- 40.04	18.58 +/- 24.95
Adhesive removal test Left paw (s)	112.51 +/- 14.04	93.78 +/- 28.95	96.57 +/- 35.52	81.42 +/- 45.88	82.38 +/- 40.92	55.07 +/- 44.20
Adhesive removal test Right paw (s)	99.36 +/- 29.07	75.47 +/- 40.26	82.13 +/- 44.20	70.21 +/- 47.13	67.67 +/- 41.00	39.33 +/- 37.39

	Sham+Veh		Sham+AT10		Sham+AT20	
Group size	5		5		5	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h
Neurological score	0	0	0	0	0	0
Grip test (N)	1.37 +/- 0.15	1.22 +/- 0.04	1.27 +/- 0.14	1.27 +/- 0.10	1.33 +/- 0.16	1.29 +/- 0.16
Hanging wire test (s)	55.47 +/- 6.22	60	54.67 +/- 6.18	60	54.67 +/- 7.67	60
Adhesive removal test Detection (s)	3.10 +/- 0.42	1.80 +/- 0.91	2.80 +/- 1.99	1.30 +/- 0.45	2.20 +/- 1.15	1.40 +/- 0.42
Adhesive removal test Left paw (s)	6 +/- 1.70	4.20 +/- 2.41	5.60 +/- 3.75	3.50 +/- 1.50	3.90 +/- 2.07	3.10 +/- 2.04
Adhesive removal test Right paw (s)	6 +/- 1.62	4.10 +/- 2.16	5.80 +/- 2.82	2.90 +/- 0.82	6.40 +/- 1.47	5.30 +/- 1.15

DISCUSSION

Les statines, par leur action hypolipémiante et leurs effets pléiotropes, tiennent une place particulière dans la prise en charge de l'AVC ischémique. Au plan expérimental, l'effet neuroprotecteur des statines en traitement préventif dans l'ischémie cérébrale a été bien établi. En cas d'utilisation à la phase aiguë les données restent plus limitées. Notre travail a permis de mettre en évidence que l'administration post-ischémique d'atorvastatine conduit à une diminution du volume infarcté ainsi qu'une réduction significative de l'œdème cérébral. Cet effet neuroprotecteur tissulaire est associé à un bénéfice clair au plan fonctionnel pour les animaux traités à la dose de 20 mg/kg/jour : le déficit neurologique est réduit, et la récupération des capacités motrices et sensitives meilleure. De plus, à cette posologie, l'atorvastatine tend à réduire la mortalité à 72 heures de l'ischémie-reperfusion cérébrale.

A côté de cet effet neuroprotecteur, nous avons mis en évidence un effet de l'atorvastatine sur le compartiment vasculaire. A 72 heures de reperfusion, on observe une préservation de la fonction endothéliale de l'ACM avec préservation de la sensibilité à la stimulation cholinergique et une tendance à la préservation de la capacité de relaxation. Cet effet bénéfique semble indépendant de la production endothéliale de NO. Par ailleurs, au niveau microvasculaire, la densité de microvaisseaux cérébraux dans la zone infarctée est augmentée, et leur intégrité paraît préservée à 72 heures de reperfusion. L'adhésion endothéliale et l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le parenchyme lésé sont limitées chez les animaux traités par atorvastatine à 24 heures de reperfusion.

Un rôle du récepteur nucléaire PPAR α dans ces effets pléiotropes apparaît clairement : nous avons en effet mis en évidence une réduction du volume d'infarctus lorsque l'atorvastatine est utilisée à la phase aiguë de l'ischémie (après 3 jours de traitement en post-ischémique) et également de façon préventive (après 14 jours de traitement et à 24h de l'ischémie/reperfusion cérébrale) qui disparaît chez les souris dont le gène codant pour PPAR α a été inactivé. En traitement préventif, la présence de ce récepteur nucléaire est également nécessaire à la réduction de l'expression des protéines d'adhésion et à l'augmentation de l'expression de la NOS endothéliale observées chez les animaux traités.

Ces résultats originaux vont être discutés selon trois axes : le premier concerne la caractérisation des effets de l'atorvastatine au niveau cellulaire et moléculaire. Le deuxième s'intéresse aux évaluations expérimentales et cliniques réalisées avec des statines, et aux limites de ces évaluations. Enfin, nous discuterons de la place des statines dans la prise en

charge de l'ischémie cérébrale en tant que stratégie thérapeutique globale à effet « disease modifier ».

I. Traitement par atorvastatine à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale : des effets bénéfiques pléiotropes

A. Caractérisation des effets pléiotropes au niveau cellulaire : neuroprotection et récupération fonctionnelle

Notre objectif était de mettre en évidence que l'effet neuroprotecteur de l'atorvastatine ne se limitait pas à une réduction du volume lésionnel, et qu'un traitement post-ischémique par cette molécule était susceptible de modifier significativement le pronostic fonctionnel. Chez l'animal l'évaluation du potentiel neuroprotecteur repose bien souvent sur une évaluation du volume lésionnel associé à une évaluation grossière du déficit neurologique, alors qu'en clinique sont utilisées des échelles de score très complètes permettant d'évaluer la récupération fonctionnelle et le handicap des patients à différents niveaux : motricité, cognition, langage, autonomie dans la vie quotidienne...

Nous avons choisi d'étudier la récupération motrice des animaux à court terme après ischémie-reperfusion. En effet, dans les 72 premières heures, l'impact moteur dans notre modèle d'ischémie cérébrale expérimentale est important et les animaux sont moins mobiles et moins réactifs. La procédure chirurgicale en elle-même impacte, de façon modérée, les performances des animaux. Les résultats des animaux sham dans les tests de la barre et du retrait de l'adhésif en témoignent. L'atteinte motrice étant susceptible d'interférer avec le bon déroulement des tests mnésiques, nous avons choisi de ne pas intégrer d'évaluation de la cognition et des capacités mnésiques, d'autant plus que ces effets sont détectables vraisemblablement plus tardivement après l'ischémie (DeVries et al., 2001).

Afin d'évaluer de manière simple et rapide le déficit neurologique, nous avons choisi d'utiliser le score neurologique de Bederson. Ce score à 5 niveaux repose principalement sur l'observation du comportement des animaux et représente une sollicitation et un stress minimes pour les animaux. Le grip test et le test de la barre sont quant à eux plus exigeants physiquement et plus anxiogènes. Le grip test présente un risque de biais potentiel puisque lors du test, le manipulateur intervient en tenant l'animal par la queue. Deux techniques sont possibles : (i) le manipulateur maintient l'animal par la queue, sans exercer de traction, et la mesure correspond à la force de traction exercée par l'animal seul ; (ii) le manipulateur exerce

une légère traction vers l'arrière afin de forcer l'animal à s'agripper à la grille. Il faut dans ce cas s'assurer d'exercer une force de traction similaire pour tous les animaux testés. Nous avons choisi dans notre étude fonctionnelle d'utiliser la première technique afin de limiter le risque de variations. Dans le test de la barre, le manipulateur n'intervient pas. Ce test est par contre très exigeant physiquement, ce qui explique les temps de maintien faibles et comparables dans les trois groupes à 24 heures de reperfusion.

Le test du retrait de l'adhésif permet une évaluation fine et précoce du déficit sensitivomoteur post-ischémique chez le rongeur, et peut être utilisé jusqu'à plusieurs semaines après ischémie-reperfusion (Bouët et al., 2007). La détection des morceaux d'adhésif ne représente pas un effort physique particulier. Le retrait peut être compliqué par l'existence d'une paralysie du membre supérieur gauche limitant les mouvements de l'animal. Toutefois, avec l'amélioration de l'état général et la récupération motrice spontanée durant la période de reperfusion, les animaux peuvent dépasser ce handicap et réussir à retirer le morceau d'adhésif de la patte gauche, à condition bien sûr de s'être aperçus de sa présence.

Cette amélioration significative et précoce de la récupération fonctionnelle, objectivée par plusieurs tests et associée à une réduction du volume lésionnel et à une tendance à la réduction de la mortalité chez les animaux traités par atorvastatine à la dose de 20 mg/kg/jour, caractérise un effet protecteur de l'atorvastatine au niveau cellulaire. Dans la littérature, l'impact bénéfique fonctionnel des statines pendant les premières heures de l'ischémie a été peu étudié. L'initiation du traitement à la reperfusion ou dans les heures suivantes permettrait la réduction du déficit neurologique à 24 heures (Céspedes-Rubio et al., 2010; Cui et al., 2010). Dans une étude, l'administration d'une dose unique de rosuvastatine après induction d'une ischémie serait associée à une réduction du volume lésionnel, du déficit neurologique et à de meilleures performances dans le test de la barre et le pole test (Prinz et al., 2008). Par contre, l'impact d'un traitement post-ischémique par statine débuté de façon décalée par rapport à l'induction de l'ischémie a été plus largement étudié. Une initiation d'un traitement par statine (atorvastatine et simvastatine) 24 ou 48 heures après induction de l'ischémie, pour une durée de 7 jours, n'aurait plus d'impact sur le volume lésionnel. L'impact bénéfique sur le déficit neurologique serait par contre conservé (Chen et al., 2003, 2005, 2006; Shehadah et al., 2010). La récupération motrice, objectivée par le test du rotarod et le foot-fault test, serait améliorée (Chen et al., 2005; Sugiura et al., 2007), et la récupération sensitivomotrice, évaluée par le test du retrait de l'adhésif et le corner test, serait également meilleure chez les

animaux traités à 7 et 14 jours (Chen et al., 2003, 2005, 2006). Le bénéfice fonctionnel semble également conservé lorsque le traitement par statine est débuté encore plus tardivement, 7 jours après induction de l'ischémie, avec réduction plus rapide du déficit neurologique et récupération motrice mise en évidence par une augmentation de l'activité locomotrice spontanée chez les animaux traités (Shimamura et al., 2007).

Nos données viennent donc conforter expérimentalement le bénéfice neuroprotecteur et fonctionnel des statines dans les premières heures après l'ischémie. L'impact fonctionnel à long terme, notamment au plan cognitif, reste par contre à évaluer.

B. Caractérisation des effets pléiotropes au niveau cellulaire : impact sur le compartiment vasculaire

Le vaisseau sanguin doit être une cible des stratégies thérapeutiques dans l'ischémie cérébrale, non seulement en termes de rétablissement du flux sanguin, mais aussi parce qu'il joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie et le fonctionnement cérébral (Fagan et al., 2004; Bastide et al., 2007). Les effets pléiotropes des statines leur permettent de moduler différentes voies physiopathologiques et différents compartiments cellulaires. L'impact des statines sur le compartiment vasculaire, à différents niveaux, participe à la limitation des lésions ischémiques.

Le traitement par statine modifie significativement l'hémodynamique cérébrale. Chez l'animal, cela se traduit par une augmentation du débit sanguin cérébral, significativement amélioré après ischémie-perfusion cérébrale (Endres et al., 1998; Yamada et al., 2000; Berger et al., 2008b; Amin-Hanjani et al., 2001). Ce mécanisme est, au moins en partie, dépendant de la NOS endothéliale qui semble jouer un rôle clé. Les statines induisent une augmentation de l'expression et de l'activité de cette enzyme (Endres et al., 1998; Laufs et al., 2002). Les animaux dépourvus de cette enzyme ne présentaient plus de modifications du débit sanguin cérébral et n'étaient plus protégés contre l'ischémie (Endres et al., 1998). De plus, l'arrêt du traitement deux jours avant induction de l'ischémie cérébrale induisait une régulation négative de l'expression de la NOS endothéliale associée à une disparition de l'effet neuroprotecteur (Gertz et al., 2003). L'impact sur le flux sanguin cérébral est également lié à l'action anticoagulante des statines, notamment par diminution de l'activation plaquettaire et augmentation de la synthèse de tPA endogène par les cellules endothéliales (Asahi et al., 2005; Gertz et al., 2003), améliorant ainsi la reperfusion microvasculaire (Shabanzadeh et al., 2005). Chez l'homme au contraire, les statines semblent n'avoir que peu d'impact sur le flux

sanguin cérébral, et paraissent plutôt améliorer la réactivité vasomotrice, c'est-à-dire la capacité des artères à répondre à un stimulus vasoactif par une variation de calibre (Giannopoulos et al., 2012).

L'impact hémodynamique est sous-tendu par un impact sur la fonction endothéliale. Chez le rat spontanément hypertendu, un traitement à long terme (1 à 2 mois) par statine améliore la relaxation endothélium-dépendante en réponse à l'acétylcholine au niveau des artères de gros calibre : aorte (Suh et al., 2010), artère mésentérique (Kansui et al., 2004) et artère carotide commune (Gelosa et al., 2010). Cet impact positif sur la fonction endothéliale est associé à une augmentation de l'expression et de l'activité de la NOS endothéliale (Suh et al., 2010). L'ischémie-reperfusion altère significativement la fonction endothéliale de l'artère cérébrale moyenne (Cipolla et al., 1997). Chez la souris soumise à ischémie cérébrale par occlusion transitoire de l'ACM, 14 jours de traitement préventif par simvastatine permettaient d'améliorer le débit sanguin cérébral et de préserver la fonction endothéliale aortique à 24 heures de reperfusion (Kim et al., 2008). Nous mettons en évidence pour la première fois une protection de l'artère cérébrale moyenne contre la dysfonction endothéliale post-ischémique par un traitement par atorvastatine initié à la phase aiguë d'une ischémie cérébrale expérimentale. Il sera intéressant d'évaluer l'impact à long terme de cette protection endothéliale précoce au plan fonctionnel, notamment sur la cognition et les troubles dépressifs.

Chez l'Homme, en dehors du contexte d'AVC, le traitement par statine est également responsable d'une amélioration de la fonction endothéliale, objectivée par la mesure plasmatique de marqueurs endothéliaux et de la dilatation flux-dépendante de l'artère brachiale. Cet effet est précoce, mis en évidence dès 3 jours de traitement par cérivastatine avant toute modification du bilan lipidique (Tsunekawa et al., 2001), et prolongé puisque toujours présent après 10 mois de traitement (Frick et al., 2002). Toutefois, l'impact d'une telle action à la phase aiguë d'une ischémie cérébrale reste à déterminer.

La modulation de la production de NO n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la protection contre la dysfonction endothéliale que semblent offrir les statines (Lee et al., 2012). Les statines inhibent la NADPH-oxydase, dont l'activité est fortement induite après ischémie-reperfusion. Elles permettent donc de réduire la production d'anion superoxyde qui au niveau endothélial joue un rôle perturbateur majeur, notamment par captation du NO. Les statines réduisent également l'expression du récepteur AT1 à l'angiotensine II, puissant

vasoconstricteur. Enfin, elles participent à la réparation et au remplacement de l'endothélium lésé. Il a été établi expérimentalement que les statines impactaient positivement les mécanismes d'angiogénèse mis en jeu après ischémie cérébrale, favorisant à la fois la formation de vaisseaux sanguins *de novo* et l'émission de ramifications à partir de vaisseaux sanguins préexistants (Zacharek et al., 2009).

En plus d'avoir un impact fonctionnel, les statines exercent un effet protecteur sur la structure même du vaisseau sanguin, en contribuant à la préservation de la lame basale et de la matrice extracellulaire. Le collagène de type IV, constituant majeur de la lame basale vasculaire, est un marqueur de choix pour la mise en évidence d'un tel effet. Quatre semaines de traitement préventif par pravastatine permettaient de limiter la perte de collagène de type IV et l'extravasation d'hémoglobine, marqueur de perméabilité vasculaire, dans le parenchyme cérébral lésé à 24 heures de reperfusion (Trinkl et al., 2006). Des résultats similaires ont été retrouvés après quatre semaines de traitement par atorvastatine 10 mg/kg/jour, la réduction de la perte collagénique était associée à une inhibition marquée de la MMP-9 (Kawai et al., 2011b). Toutefois, une administration d'atorvastatine 4 heures après occlusion embolique de l'artère cérébrale moyenne ne limitait pas significativement la destruction du collagène de type IV et l'activité de la MMP-9 à 24 heures de reperfusion (Zhang et al., 2005).

Nous ne mettons effectivement pas en évidence de réduction de la destruction de la lame basale des vaisseaux sanguins cérébraux, évalué par l'intensité moyenne de fluorescence du marquage pour le collagène de type IV à 24 heures de reperfusion après deux administrations d'atorvastatine (à la reperfusion et 5 heures plus tard). Ce paramètre était par contre augmenté chez les animaux traités par atorvastatine 20 mg/kg/jour après 3 jours de traitement post-ischémique. L'impact du traitement sur l'intégrité microvasculaire sera à confirmer par l'étude de l'extravasation d'un marqueur fluorescent, le dextran-FITC, à 24 et 72 heures de reperfusion. Par ailleurs, la densité microvasculaire, évaluée par l'aire occupée par le marquage, était significativement supérieure dans notre étude à 72 heures de reperfusion, après trois jours de traitement biquotidien par atorvastatine. Le rôle des effets pro-angiogéniques des statines dans cette augmentation est une piste intéressante et doit être évalué pour expliquer cet effet positif du traitement.

Les leucocytes, et particulièrement les polynucléaires neutrophiles, jouent un rôle particulier au plan physiopathologique dans l'ischémie cérébrale (Emerich et al., 2002). Ils

interviennent dans les deux aspects de l'atteinte vasculaire dont nous venons de discuter, à savoir l'altération de la fonction endothéliale et la perte de structure des vaisseaux sanguins. Il a en effet été montré que l'adhésion, le roulement et l'infiltration des leucocytes participaient activement à l'établissement de la dysfonction endothéliale post-ischémique. L'induction d'une neutropénie avant ischémie-reperfusion cérébrale permettait une prévention complète de la dysfonction endothéliale chez le rat, la leucopénie n'était associée qu'à une protection endothéliale partielle (Pétrault et al., 2005). De plus, les leucocytes, après infiltration dans le parenchyme cérébral, participent activement au développement des dommages cellulaires, et *a fortiori* vasculaires, notamment par la production *in situ* d'espèces radicalaires, la libération de cytokines pro-inflammatoires et de métalloprotéases (Gidday et al., 2005; Justicia et al., 2003). L'induction d'une leucopénie ou d'une neutropénie permettait de réduire l'infiltration des polynucléaires neutrophiles et le risque de transformation hémorragique après administration de rtPA chez le rat soumis à ischémie-reperfusion cérébrale, et participait à la préservation de la fonction endothéliale (Gautier et al., 2009).

Les données cliniques disponibles laissent effectivement penser que les leucocytes jouent un rôle dans l'ischémie cérébrale, mais ce rôle paraît complexe. A la phase aiguë, des taux élevés de leucocytes totaux et de polynucléaires neutrophiles étaient associés à une sévérité initiale supérieure de l'AVC, alors qu'un taux bas de lymphocytes était associé à un moins bon pronostic fonctionnel à trois mois (Kim et al., 2012).

Les statines participent à la protection vasculaire en modulant les interactions leucocytes-endothélium à différents niveaux. Elles interviennent en amont, en limitant par leur action anti-inflammatoire la production de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs chimio-attractants pour les leucocytes comme MCP-1 (Gelosa et al., 2010; Kawai et al., 2011a; Sironi et al., 2006).

Dans le cadre d'un traitement aigu, une seule étude met en évidence une diminution de l'expression d'ICAM-1 à 24 heures de reperfusion chez le rat traité par une dose unique d'atorvastatine 20 mg/kg après occlusion embolique de l'ACM (Zhang et al., 2005). La simvastatine, administrée après induction d'un traumatisme crânien chez le rat, induisait une réduction marquée de l'expression d'ICAM-1 et de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le parenchyme cérébral. L'intégrité de la BHE était préservée, le volume d'œdème diminué. L'impact fonctionnel était réduit chez les animaux traités (Béziaud et al., 2011). Nous montrons clairement, à 24 heures de reperfusion, une réduction de l'expression

d'ICAM-1 ainsi qu'une diminution de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans la zone infarctée après 24 heures de traitement par atorvastatine. A 72 heures, l'intensité de ces deux phénomènes était réduite, sans effet cependant du traitement par atorvastatine. Cependant, l'expression d'ICAM-1 est maximale 12 à 24 heures après induction de l'ischémie tout comme l'infiltration des polynucléaires neutrophiles, et elles décroissent toutes deux rapidement par la suite (Ge et al., 2000; del Zoppo, 2009b). Les cinétiques parallèles de ces deux phénomènes peuvent expliquer à la fois l'efficacité du traitement par atorvastatine à 24 heures de reperfusion, l'expression d'ICAM-1 et l'infiltration des polynucléaires neutrophiles étant à leur maximum, et son apparente inefficacité à 72 heures de reperfusion, ces deux phénomènes étant d'intensité extrêmement réduite et donc moins sensibles à la modulation.

Il a également été montré expérimentalement que les statines en traitement préventif diminuaient l'expression des protéines d'adhésion endothéliales induite après ischémie-reperfusion (Mayanagi et al., 2008) et l'expression des intégrines leucocytaires correspondantes (Weitz-Schmidt et al., 2001), contribuant au final à réduire l'infiltration leucocytaire (Kawashima et al., 2003). Nous confirmons la réduction de l'expression des protéines d'adhésion endothéliales (ICAM-1 et VCAM) après 14 jours de traitement préventif par atorvastatine avant ischémie-reperfusion.

C. Caractérisation des effets pléiotropes au niveau moléculaire : implication du récepteur nucléaire PPAR α

Le récepteur PPAR α induit, après activation, des effets pléiotropes qui en font une cible d'intérêt dans l'ischémie cérébrale. Il est maintenant bien établi que les agonistes de ce récepteur sont protecteurs dans l'ischémie cérébrale expérimentale (Deplanque et al., 2003; Guo et al., 2010; Ouk et al., 2009). Il existe des similitudes marquées dans les mécanismes d'action des statines et des activateurs de PPAR α , qui laissent penser à une interaction entre PPAR α et les statines (Paumelle et Staels, 2008). Le récepteur PPAR α présente, comme les statines, des effets anti-oxydants et anti-inflammatoires lui conférant un potentiel neuroprotecteur (Deplanque et al., 2003; Ouk et al., 2009). Nous avons mis en évidence le rôle joué par PPAR α dans l'effet neuroprotecteur de l'atorvastatine, dans un modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale (article n°1). L'effet du traitement préventif ou aigu par atorvastatine sur le volume lésionnel, significativement diminué chez les souris sauvages, n'était plus présent chez les animaux mutés n'exprimant pas PPAR α .

Les statines et les activateurs de PPAR α exercent des effets anti-inflammatoires similaires, limitant la libération de cytokines et enzymes à rôle pro-inflammatoire, l'expression de protéines d'adhésion, le recrutement et l'activation leucocytaire (Jasińska et al., 2007). PPAR α semble être un élément clé de ces propriétés. Les animaux n'exprimant pas PPAR α développent, en situation pathologique, des réactions inflammatoires plus importantes et sont moins sensibles, voire ne tirent aucun bénéfice d'un traitement par statines (Rinaldi et al., 2011; Esposito et al., 2012). Cela a été mis en évidence dans différents modèles animaux : inflammation locorégionale (Paumelle et al., 2006), choc non septique (Rinaldi et al., 2011), neuro-inflammation (Wang et Namura, 2011) et lésion traumatique de la moelle épinière (Esposito et al., 2012). Le facteur de transcription NF κ B, sur lequel PPAR α exerce un effet transrépresseur, paraît jouer un rôle central (Collino et al., 2006; Esposito et al., 2012; Paumelle et al., 2006). L'activation de PPAR α après ischémie cérébrale expérimentale induisait une réduction du volume lésionnel qui était associée à un effet anti-inflammatoire, avec diminution de l'expression des protéines d'adhésion et de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles (Collino et al., 2006; Deplanque et al., 2003; Ouk et al., 2009). Dans notre étude, la modulation par l'atorvastatine de l'expression post-ischémique des effecteurs de l'inflammation étudiés : IL-6, protéines d'adhésion ICAM-1 et VCAM, NOS inductible, était réduite chez les souris n'exprimant pas PPAR α .

L'activation de PPAR α par son agoniste le fénofibrate impacte le compartiment vasculaire cérébral après ischémie-reperfusion. Elle va notamment entraîner une amélioration du débit sanguin cérébral (Guo et al., 2010), protéger contre la dysfonction endothéliale post-ischémique (Ouk et al., 2009) et préserver *in vitro* l'imperméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Mysiorek et al., 2009). Le rôle de la NO synthase endothéliale dans l'impact vasculaire de PPAR α a été suggéré par analogie avec les statines, mais n'est pas clairement établi. Une augmentation de l'expression de la NO synthase endothéliale après traitement par le fénofibrate a été mise en évidence *in vitro* (Goya et al., 2004), mais n'a pas été confirmée *in vivo* (Deplanque et al., 2003; Guo et al., 2009, 2010). Il a également été proposé que cet effet dépende d'une modification de l'activité de la NO synthase endothéliale, sans augmentation du pool disponible. Dix jours de traitement par fénofibrate induisaient une augmentation de l'activité de la NO synthase endothéliale au niveau pulmonaire, par augmentation de la phosphorylation en position 1177. L'expression génique n'était pas modifiée (Becker et al., 2012). Dans notre étude, le traitement préventif par atorvastatine provoquait une augmentation de l'expression de la NO synthase endothéliale chez les animaux sauvages, et

cette induction n'était plus présente chez les animaux mutés. Cela confirme le rôle de PPAR α dans l'augmentation de l'expression de la NO synthase endothéliale par l'atorvastatine.

D. Aspects restant à évaluer dans la caractérisation de l'effet pléiotrope des statines : impact sur les cellules gliales et glioprotection

Dans ce travail, nous avons étudié les effets neuroprotecteurs de l'atorvastatine, reflétant son impact global sur l'unité neuroglivascular. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au compartiment vasculaire, laissant de fait de côté le compartiment glial. Dans les études expérimentales, le compartiment glial n'est encore que très rarement au centre des investigations. Bien souvent, l'étude des marqueurs d'activation microgliale (Ox-42, Iba-1...) ou astrocytaire (GFAP) fait partie d'une évaluation beaucoup plus large visant à mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire de la statine testée (Céspedes-Rubio et al., 2010; Lee et al., 2008; Shehadah et al., 2010). Les statines semblent en effet limiter l'activation gliale par une action anti-inflammatoire, démontrée *in vitro* sur culture de cellules microgliales et d'astrocytes corticaux traités par LPS : diminution de l'activation de NF κ B, diminution de la libération de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines : IL-1 β , IL-6, TNF α , prostaglandines : PGE2) et de NOS inductible (Pahan et al., 1997; Tringali et al., 2004). Il semblerait également qu'un traitement par statine permette de limiter la libération de MMP-9 astrocytaire induite par le rtPA (Wang et al., 2006).

L'évolution des connaissances sur les interactions au sein de l'unité neuroglivascular et sur les rôles des cellules gliales, notamment l'organisation des astrocytes en réseaux fonctionnels, renforce la nécessité de développer des approches de glioprotection. Il existe aujourd'hui des techniques et des modèles permettant d'étudier *in vitro* et *in vivo* les cellules gliales (Pannasch et Rouach, 2013) : lignées d'animaux transgéniques, techniques d'immunofluorescence et d'électrophysiologie... Leur application à l'ischémie cérébrale expérimentale pourra permettre d'approfondir les connaissances de l'impact sur les cellules gliales, et de tester dans un deuxième temps des stratégies de protection, comme les statines.

II. Statines dans l'ischémie cérébrale : de l'animal à l'Homme

A. Bilan de l'évaluation préclinique des statines

Deux méta-analyses portant sur l'effet neuroprotecteur des statines dans l'ischémie cérébrale expérimentale ont été publiées en 2012. La première méta-analyse évaluait l'effet

neuroprotecteur des statines dans l'ischémie cérébrale expérimentale, tous modèles et toutes conditions confondues (García-Bonilla et al., 2012). La deuxième méta-analyse s'intéressait à l'effet neuroprotecteur d'un traitement post-ischémique par statines dans les modèles d'ischémie cérébrale focale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (Baryan et al., 2012). La qualité des études était appréciée au moyen des critères CAMARADES (Collaborative Approach to Meta Analysis and Review of Animal Data from Experimental Stroke – Macleod et al., 2004), et également avec les critères STAIR (Fisher et al., 2009) dans la deuxième méta-analyse (Baryan et al., 2012). Les principaux résultats de ces deux méta-analyses sont repris dans le tableau 20.

Tableau 20: Principaux résultats des méta-analyses de l'effet neuroprotecteur des statines dans l'ischémie cérébrale expérimentale.

	Baryan et al, 2012	Garcia-Bonilla et al, 2012
Nombre d'études incluses	18	41
Réduction du volume lésionnel	11,20 % [8,10% - 14,30%], p < 0,001	25,12% [20,66% – 29,58%], p < 0,001
Réduction du déficit neurologique	0,7 points [0,40 - 1,10], p < 0,0001	20,36% [14,17% – 26,56%], p < 0,001
<i>Critères méthodologiques</i>		
Randomisation	9/18 (50 %)	17/41 (41,4 %)
Allocation cachée	8/18 (44%)	12/41 (29,3%)
Evaluation en aveugle	12/18 (67%)	

Toutes les études incluses comprenaient un groupe de référence non traité ou traité par placebo. Les auteurs soulignent la qualité relativement modeste des études reprises dans ces deux analyses, en lien notamment avec les limites méthodologiques (tableau 20) : faible fréquence de la randomisation, de l'allocation cachée et de l'évaluation en aveugle. L'effet protecteur augmentait avec la dose et la répétition des administrations. Il était moins important en cas d'administration post-ischémique, et d'autant plus faible que la première administration était retardée après induction de l'ischémie (Baryan et al., 2012; García-Bonilla et al., 2012). Une autre limite tient au choix des animaux : toutes les études retrouvées

sont basées sur des modèles de rats ou souris mâles, jeunes. Il n'existe que quelques études utilisant des animaux porteurs de facteurs de risque vasculaire, et aucune étude utilisant des rongeurs femelles ou des primates (Baryan et al., 2012). L'efficacité du traitement, tous schémas d'administration confondus, ne paraissait pas différer entre les modèles d'occlusion permanente et transitoire (García-Bonilla et al., 2012). Par contre, l'efficacité semblait supérieure dans les modèles d'occlusion permanente en cas de traitement aigu (Baryan et al., 2012).

Le choix du modèle est une source de variabilité majeure, conditionnant à la fois l'impact lésionnel et fonctionnel et la sensibilité au traitement : réduction moyenne du volume lésionnel de 25,12 % tous modèles et tous schémas de traitement confondus (García-Bonilla et al., 2012) contre 11,20 % lorsque le traitement était débuté après occlusion de l'artère cérébrale moyenne (Baryan et al., 2012). Il existe à l'heure actuelle différents modèles animaux d'accident vasculaire cérébral, applicables chez le rongeur et chez les mammifères de plus grande taille (lapin, chat, chien, primates non humains) : (i) modèles reposant sur l'injection de thrombine, induisant une coagulation *in situ*, ou d'endothéline, induisant une vasoconstriction ; (ii) modèle photothrombotique par injection d'une substance photoactive et irradiation de la zone d'intérêt ; et (iii) modèles concernant le territoire de l'artère cérébrale moyenne par différentes techniques : occlusion embolique, occlusion mécanique par l'insertion d'une suture, transitoire ou permanente, ligature permanente ou électrocoagulation de l'ACM (Durukan et Tatlisumak, 2007; Mergenthaler et Meisel, 2012). Les résultats et la mortalité liée au modèle peuvent être influencés par la souche, le sexe, l'âge et la présence de comorbidités associées (hypertension artérielle, diabète...) (Liu et McCullough, 2012). L'anesthésique, pouvant être lui-même neuroprotecteur, est un facteur de variabilité potentiel. La reproductibilité et le risque d'échec du modèle sont des facteurs de variabilité technique qui vont influencer sur le pourcentage de réussite et la mortalité. Enfin, l'évolution des paramètres physiologiques chez l'animal, au cours de l'induction de l'ischémie et après, va également avoir un impact : la température corporelle (l'hypothermie étant protectrice et l'hyperthermie délétère), les variations tensionnelles, les variations des gaz du sang... Ces paramètres ne sont pas forcément accessibles et modifiables par le manipulateur (Durukan et Tatlisumak, 2007).

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi d'utiliser un modèle d'occlusion transitoire mécanique de l'artère cérébrale moyenne chez la souris. Ce modèle est réalisé au niveau du

tronc carotidien dans la région cervicale et respecte l'intégrité de la boîte crânienne et des méninges. Il permet d'obtenir des lésions cérébrales reproductibles et un déficit focal évaluable au moyen de nombreux tests fonctionnels, et le taux d'échec (15 à 20 %) et la mortalité à 24 heures de reperfusion (17 à 25 %) sont raisonnables.

Le choix de la statine et du schéma d'administration constitue également une source d'hétérogénéité majeure, comme le montrent les deux méta-analyses. Parmi les trois statines les plus évaluées, la simvastatine paraît posséder le potentiel neuroprotecteur le plus marqué devant l'atorvastatine, l'effet de la rosuvastatine paraît anecdotique (García-Bonilla et al., 2012). Comme nous l'avons évoqué précédemment, les statines présentent des profils pharmacodynamique et pharmacocinétique différents, mais l'impact réel sur leur potentiel neuroprotecteur reste peu clair. La simvastatine et l'atorvastatine sont très lipophiles, et vont donc franchir la BHE plus aisément que la rosuvastatine, qui elle est hydrophile (Sierra et al., 2011). Ce paramètre de lipophilie et les données expérimentales ont effectivement orienté notre choix vers l'atorvastatine, mais ce sont surtout les données cliniques, notamment l'étude SPARCL (Amarenco et al., 2006), qui ont confirmé notre choix.

Si l'évaluation expérimentale des statines en traitement préventif et en traitement post-ischémique commence à s'étoffer, deux axes importants restent toutefois à explorer : l'association au traitement thrombolytique à la phase aiguë et l'intérêt de poursuivre le traitement à long terme après AVC ischémique. Une évaluation préclinique plus complète pourrait apporter une base de réponses, notamment en termes de mécanismes, aux interrogations des cliniciens. Chez l'animal, les études associant statine et rtPA sont peu nombreuses (tableau 21). L'interaction entre un traitement préventif par statine et l'administration de rtPA, interrogation majeure au plan clinique, n'a été évaluée que dans une seule étude expérimentale : un traitement par simvastatine était débuté 24 heures avant induction de l'ischémie et thrombolyse chez le lapin. Les auteurs ne mettaient pas en évidence de bénéfice ou de risque supplémentaire associé au traitement par statine. Ils retrouvaient par contre une réduction du risque de transformation hémorragique secondaire (Lapchak et Han, 2009).

Tableau 21 : Statines et thrombolyse – données précliniques.

Molécules testées	Souches et modèles	Dose et voie d'administration	Effets	Références
<i>Traitement préventif</i>				
Simvastatine	Modèle TE (lapin)	Sim : 20 mg/kg SC 24h et 4 avant O rtPA : 3,3 mg/kg IV 1 heure après O	Pas d'effet sur le volume lésionnel ↓ incidence et volume des hémorragies	Lapchak et Han, 2009
<i>Traitement aigu</i>				
Rosuvastatine	tMCAO (souris C57BL/6J souches sauvage – KO NOS-3)	rtPA : 10 mg/kg IV à la reperfusion Rosuva : 20 mg/kg IP à la reperfusion	rtPA : ↑volume lésionnel + rosuvastatine : ↓volume lésionnel, ↑NOS-3, pas d'effet chez KO	Kilic et al., 2005
Atorvastatine	Modèle TE (rats Wistar)	rtPA : 10 mg/kg IV 4 heures après O AT : 20 mg/kg SC à 4 et 28 heures	↓volume lésionnel ↓déficit neurologique ↓TF, vWF, PAR1, ICAM-1, MMP-9 ↑reperfusion et intégrité microvasculaire Pas d'effet sur NOS-3	Zhang et al., 2005
Atorvastatine	Modèle TE (rats Wistar)	rtPA : 20 mg/kg IV 4 heures après O AT 20 mg/kg SC à 4 et 28 heures	rtPA : ↑TF, PAR1, MMP-2, MMP-9 pas d'effet si AT seule ↓ si AT + rtPA	Liu et al., 2006
Atorvastatine	Modèle TE (rats Wistar)	rtPA : 10 mg/kg IV 4 heures après O AT 20 mg/kg SC à 4 et 28 heures	↑Akt AT : ↑EGR1, VEGF rtPA+AT : pas d'effet sur EGR1 et VEGF	Zhang et al., 2007

EGR1 : Récepteur du facteur de croissance épidermique-1 ; MMP : Métalloprotéase ; PAR 1 : Proteinase-Activated Receptor-1 ; TF : Facteur tissulaire ; VEGF : Facteur de croissance vasculaire endothélial ; vWF : Facteur von Willebrand.

C'est principalement l'impact d'un traitement aigu par statine sur la fenêtre thérapeutique du rtPA et le risque de transformation hémorragique secondaire qui ont été étudiés. L'association concomitante d'une statine au rtPA semblait bénéfique, et paraissait

même exercer une action synergique. L'administration conjointe de rtPA et d'une statine 4 heures après occlusion artérielle permettait, par rapport au traitement par rtPA seul, de réduire le volume lésionnel et le volume d'hémorragie tout en améliorant la reperfusion (Kilic et al., 2005a; Liu et al., 2006; Zhang et al., 2007). Le traitement par statine semblait réduire l'incidence des transformations hémorragiques par diminution de l'expression des protéines d'adhésion, du récepteur à la thrombine PAR-1, et des métalloprotéases matricielles (Liu et al., 2006; Zhang et al., 2005). Ce délai d'administration du traitement par statine permettait de conserver le bénéfice d'un traitement par rtPA sans majoration du risque hémorragique en augmentant la fenêtre thérapeutique à 6 heures après occlusion artérielle (Zhang et al., 2009).

Dans la majorité des études expérimentales évaluant les statines dans l'ischémie cérébrale, la durée de suivi des animaux reste relativement courte. Elle n'excède que très rarement 24 heures dans le cas d'un traitement préventif et 7 jours dans le cas d'un traitement aigu (García-Bonilla et al., 2012). Il n'existe dans la littérature que quelques études précliniques portant sur les conséquences à long terme d'un traitement par statines après ischémie cérébrale (tableau 22). Un traitement prophylactique de 14 jours par atorvastatine permettait de réduire significativement l'impact fonctionnel à 21 jours après occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne (Yrjänheikki et al., 2005). Chez le rat âgé, un traitement par atorvastatine à faible dose (3 mg/kg/jour) débuté 24 heures après occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne durant 7 jours était sans effet sur le volume lésionnel mais permettait une majoration des phénomènes de neurogénèse associée à une amélioration de la récupération fonctionnelle à 28 jours (Chen et al., 2006). Toujours dans le même modèle d'occlusion permanente, 3 mois de traitement par fluvastatine débuté 7 jours après induction de l'ischémie permettaient de réduire significativement le déficit cognitif post-ischémique, ainsi que les dépôts de peptide β -amyloïde dans la région thalamique. Il n'y avait pas d'effet du traitement sur les progéniteurs neuraux, par contre l'angiogénèse était induite avec augmentation du nombre de microvaisseaux à 100 jours en bordure de la zone infarctée (Shimamura et al., 2007).

Tableau 22 : Statines et traitement à long terme – données précliniques.

Molécules testées	Souches et modèles	Dose et voie d'administration	Effets	Références
<i>Traitement préventif</i>				
Atorvastatine	pMCAO (rats Long-Evans)	10 mg/kg/j PO 14 jours	↓volume lésionnel à 7 et 21 j Amélioration récupération fonctionnelle Pas d'effet sur DSC	Yrjänheikki et al., 2005
<i>Traitement aigu</i>				
Atorvastatine	pMCAO (rats Wistar âgés)	3 mg/kg/j PO 1 ^{ère} dose 24h après O 7 jours	Pas d'effet sur volume lésionnel Amélioration récupération fonctionnelle à 28 jours ↑VEGF, différenciation progéniteurs neuraux	Chen et al., 2006
Fluvastatine	pMCAO (rats Wistar)	5 mg/kg/j PO 1 ^{ère} dose 7 j après O 12 semaines	Pas d'effet sur volume lésionnel ↓déclin cognitif ↑angiogénèse ↓dépôts A β	Shimamura et al., 2007

A β : peptide bêta-amyloïde ; DSC : Débit sanguin cérébral.

B. Bilan de l'évaluation clinique des statines

La diminution du risque d'AVC chez les patients traités en prévention primaire a été confirmée par une méta-analyse menée par Taylor et collaborateurs (2013) : RR = 0,78 ; IC à 95% [0,68 – 0,89]. La réduction du risque porte sur les AVC non létaux : RR = 0,69 ; IC à 95% [0,58 – 0,83]. Le risque d'AVC léthal n'était pas significativement réduit : RR = 0,63 ; IC à 95% [0,18 ; 2,23] (Taylor et al., 2013). La diminution du risque de récurrence d'AVC ischémique est également bien établie, notamment grâce à l'étude SPARCL (Amarenco et al., 2006). Une nouvelle étude interventionnelle de prévention secondaire, l'étude TST (Treat Stroke to Target), a été débutée en mars 2010. Le taux de LDL-cholestérol sera maintenu autour de 100 mg/dL ou sous la valeur de 70 mg/dL par un traitement hypolipémiant comprenant au moins une statine. Cette étude permettra d'évaluer l'impact à 3 ans de ce traitement sur le risque de récurrence d'AVC et sur l'incidence des événements

cardiovasculaires après un premier AVC ou AIT. Les premiers résultats devraient être disponibles en 2016 (Amarenco, 2013).

L'impact des statines sur la sévérité de l'AVC et le pronostic fonctionnel semble intéressant. La prise d'un traitement hypolipémiant, statine ou fibrate, en prévention primaire est associée à une réduction de la sévérité initiale de l'AVC, et à une réduction du déficit neurologique à 8 jours (Deplanque et al., 2006). L'analyse du registre français des AVC entre 2006 et 2011 ne mettait par contre pas en évidence de diminution de la sévérité initiale du premier AVC ischémique chez les patients préalablement traités par statine. La probabilité d'évolution fonctionnelle défavorable à 3 mois tendait par contre à être réduite (OR = 0,76 ; IC à 95% [0,53 – 1,09]) (Aboa-Eboulé et al., 2013). La prise d'un traitement par statine avant et/ou pendant l'hospitalisation pour AVC était associée à une diminution du handicap et de la fréquence des institutionnalisations à la sortie (Flint et al., 2012b). Une méta-analyse récente (Ni Chroinin et al., 2013), reprenant les données de plus de 113 000 patients issus de 27 études cliniques, mettait en évidence un bénéfice chez les patients traités par statine avant AVC ischémique. Le déficit fonctionnel était significativement réduit (à 3 mois, OR global = 1,41 ; IC à 95% [1,29 – 1,56]) comme la mortalité (à 3 mois, OR global = 0,71 ; IC à 95% [0,62 – 0,82]). La diminution de la mortalité était toujours significative à 1 an. Les études observationnelles semblent indiquer une diminution du handicap et de la mortalité, alors que les études randomisées et contrôlées ne retrouvent pas de bénéfice significatif (Ni Chroinin et al., 2013). Ces résultats seront à confirmer par la mise en place d'études méthodologiquement robustes et sur de grands effectifs, spécifiquement conçues pour évaluer l'impact du traitement par statine.

L'intérêt des statines dans la réduction du risque de survenue d'AVC est indéniable. L'intérêt dans l'amélioration du pronostic fonctionnel chez les patients traités de façon préventive est également notable. Par contre, l'évaluation du bénéfice d'un traitement par statine à la phase aiguë sur le pronostic fonctionnel nécessite et mérite une évaluation plus approfondie, notamment chez les patients « naïfs ». C'est dans ce contexte que deux études randomisées contrôlées et en double aveugle ont été récemment mises en place. L'étude de phase III EUREKA (Effects of Very Early Use of Rosuvastatin in Preventing Recurrence of Ischemic Stroke) repose sur un traitement par rosuvastatine 20 mg/jour, débuté dans les 18 heures suivant l'apparition des symptômes et poursuivi pendant 14 jours (Hoe Heo, 2010). L'étude de phase II NeuSTART II (Neuroprotection with Statin Therapy for Acute

Recovery Trial) repose sur un traitement par lovastatine haute dose (640 mg/jour) débuté dans les 24 heures après le début des symptômes et poursuivi 3 jours (Elkind, 2010). Ces deux études permettront de rassembler des informations sur l'efficacité et la tolérance des statines à la phase aiguë.

A l'image de l'évaluation expérimentale, l'évaluation clinique de l'association des statines au rtPA mérite d'être complétée. Des doutes ont en effet été émis quant au risque d'hémorragie intracérébrale chez les patients préalablement traités par statines. L'inquiétude portait sur les hémorragies primitives comme sur celles résultant de la transformation hémorragique d'un AVC ischémique, thrombolysé ou non. Il semble maintenant établi que le traitement par statine n'est pas un facteur de risque, ni un facteur protecteur d'ailleurs, dans les hémorragies cérébrales primitives (McKinney et Kostis, 2012; Taylor et al., 2013). Un traitement préalable par statine semble par contre être associé à une augmentation du risque de transformation hémorragique après administration de rtPA, mais l'impact en termes de morbi-mortalité reste à évaluer (Cappellari, 2011; Engelter et al., 2011; Martinez-Ramirez et al., 2012).

En accord avec les données expérimentales, l'introduction d'un traitement par statine à la phase aiguë d'un AVC paraît par contre bénéfique. L'initiation du traitement à la phase aiguë, dans les 24 heures suivant la thrombolyse, ne semble pas poser de problème de tolérance particulier et semble même être à l'origine d'un bénéfice supplémentaire (Cappellari, 2011; Cappellari et al., 2013). C'est pour confirmer l'efficacité d'un tel schéma thérapeutique que l'étude de phase IV STARS07 (Stroke Treatment With Acute Reperfusion and Simvastatin) multicentrique, randomisée et en double aveugle. Elle permettra d'évaluer l'impact d'un traitement par simvastatine débuté dans les 12 heures suivant l'apparition des symptômes, et le risque éventuel en cas de thrombolyse associée (Montaner, 2012).

Les données cliniques concernant l'impact des statines au-delà de 3 mois après survenue d'un AVC restent rares. Le suivi de 453 patients âgés dont le traitement par statine avait été initié lors de l'hospitalisation pour AVC ischémique mettait en évidence une amélioration de la survie (HR = 0,33 ; IC à 95% [0,20 – 0,54]) et une diminution du handicap résiduel après un an de suivi (OR = 2,09 ; IC à 95% [1,25 – 3,52]), alors qu'il n'existait pas d'effet bénéfique à 3 mois (Hjalmarsson et al., 2012). Le registre de Londres Sud a permis le suivi de 4413 patients sur les dix années suivant la survenue d'un premier AVC. Les auteurs mettaient en évidence une réduction modérée du risque de déclin cognitif chez les patients

suivis traités par statine en prévention secondaire (RR = 0,90 ; IC à 95% [0,76 – 1,06]) (Douiri et al., 2013). L'analyse des données issues de la cohorte lilloise Biostroke ne mettait pas en évidence d'effet protecteur contre le déclin cognitif chez les patients traités par un hypolipémiant, dont une statine, avant survenue de l'AVC (OR = 0,44 ; IC à 95% [0,11 – 1,56]) (Bordet, 2008).

III. Les statines : vers le concept de disease-modifier ?

L'évaluation préclinique des statines en traitement préventif et à la phase aiguë, dans laquelle nous nous inscrivons, a permis d'approfondir la connaissance des mécanismes sous-tendant leurs effets pléiotropes. Les statines étant largement utilisées depuis de nombreuses années en clinique, la constitution et le suivi de larges cohortes ont permis en parallèle une évaluation approfondie chez l'Homme. Parmi les nombreuses stratégies de neuroprotection testées ces dernières années, les statines font partie des rares candidats dont l'évaluation clinique a été poursuivie. Les études en cours, basées sur l'introduction d'un traitement par statine à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale, permettront d'affiner la connaissance du bénéfice clinique et également le risque éventuel en cas d'administration conjointe à l'altéplase. Des études complémentaires, aussi bien expérimentales que cliniques, sont par contre nécessaires pour évaluer plus précisément l'impact à long terme des statines sur la récupération fonctionnelle et les conséquences tardives de l'AVC, notamment au plan cognitif.

Au vu des données disponibles les statines pourraient s'inscrire dans une stratégie pharmacologique globale, utilisable à toutes les phases de l'AVC, à la fois en prévention, à la phase aiguë et à long terme, et donc capables de modifier le cours évolutif de cette pathologie. Ce concept correspond aux médicaments dits à action « disease-modifier » (EMA, 2006). La définition a été proposée pour les pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, par opposition aux traitements symptomatiques masquant les signes cliniques sans modifier la charge lésionnelle, et paraît être transposable aux statines dans la prise en charge de l'AVC.

Dans l'AVC, l'effet disease-modifier d'un candidat médicament devrait idéalement s'exprimer aux trois phases de la pathologie, c'est-à-dire :

- Etre efficace en prévention primaire et secondaire ;
- Diminuer l'impact immédiat et retardé de l'occlusion vasculaire si elle survient ;

- Réduire les conséquences à long terme par la promotion de mécanismes de réparation, et réduire les risques de récurrence.

Les statines sont-elles susceptibles de répondre à de tels critères ?

Oui, car :

(i) Les statines sont efficaces en prévention primaire et secondaire de l'AVC ischémique. La diminution du risque de premier accident vasculaire cérébral et du risque de récurrence a été clairement établie chez les patients traités par statines, et ces résultats ont été reproduits dans de nombreuses études, menées par différentes équipes sur différentes cohortes de patients, représentant au total des effectifs très importants. En témoigne par exemple la méta-analyse de Ni-Chroinin et collaborateurs (2013), qui exploite les données de plus de 113 000 patients (Ni Chroinin et al., 2013). Par ailleurs, des résultats similaires ont été retrouvés expérimentalement par des études sur la souche de rats spontanément hypertendus présentant des AVC spontanés (SHR-SP).

(ii) Les statines exercent un effet neuroprotecteur avéré dans l'ischémie cérébrale expérimentale, et semblent exercer des effets similaires chez l'Homme. L'effet neuroprotecteur des statines par la modulation des différentes voies physiopathologiques mises en jeu à la phase aiguë de l'ischémie cérébrale a été démontré dans les modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale globale et focale, en présence et en l'absence de reperfusion. Les animaux traités tirent un bénéfice du traitement, qu'il ait été initié avant ou après l'occlusion vasculaire. Les données concernant l'association au rtPA sont peu nombreuses mais plutôt rassurantes. L'administration concomitante d'une statine semble limiter le risque de transformation hémorragique et permettre d'allonger la fenêtre temporelle d'administration du rtPA. Chez l'Homme, les données recueillies sur l'impact des statines à la phase aiguë et ses conséquences proviennent principalement d'études observationnelles rétrospectives, et non d'études comparatives prospectives. Le traitement par statines semble toutefois avoir un impact positif sur le pronostic fonctionnel et la mortalité, qui reste à confirmer par des études cliniques mises en place spécifiquement pour évaluer ces paramètres. La possibilité de l'association à l'altéplase est elle aussi à évaluer plus précisément, d'autant qu'il semble exister une dichotomie entre le traitement préventif, qui semble plutôt augmenter le risque de transformation hémorragique, et le traitement aigu, qui semble au contraire apporter un bénéfice supplémentaire.

(iii) Les données sur l'impact des statines à long terme sont très limitées, mais encourageantes. Les résultats expérimentaux, au même titre que les études à moyen terme (7 à 14 jours de traitement post-ischémique), semblent indiquer un impact positif du traitement par statine sur la récupération fonctionnelle et cognitive par promotion des mécanismes de réparation. Au plan clinique, les études se sont plutôt attachées à évaluer le risque de récurrence, la mortalité et le pronostic fonctionnel. Les données disponibles semblent indiquer, comme chez l'animal, une réduction du handicap fonctionnel et de l'atteinte cognitive à long terme.

La principale limitation empêchant la classification des statines comme *disease modifiers* est le manque de données sur les effets à long terme après ischémie cérébrale. Expérimentalement, le suivi et l'évaluation des animaux après ischémie cérébrale expérimentale est assez lourd, ce qui explique le faible nombre d'études retrouvées. Par ailleurs, nous ne disposons pas à l'heure actuelle de données cliniques sur l'impact des statines sur les complications sortant du champ du handicap physique comme les troubles dépressifs par exemple. Les données concernant la récupération motrice et la protection cognitive restent extrêmement limitées. Concernant l'impact sur la cognition, les études menées chez le sujet âgé peuvent peut-être offrir un début de réponse. La méta-analyse de Wong et collaborateurs (2013) retrouve une diminution du risque de démence ($RR = 0,82$; IC à 95% [0,69 – 0,97]) et du risque de maladie d'Alzheimer ($RR = 0,70$; IC à 95% [0,60 – 0,83]) chez les sujets traités par statine (Wong et al., 2013). Les auteurs avaient toutefois exclus de l'analyse l'étude PROSPER (Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk), qui ne retrouvait de modification du déclin cognitif au bout de trois ans de suivi chez les patients traités par pravastatine 40 mg/jour par rapport aux patients du groupe placebo (Trompet et al., 2010). Il semble également que le traitement par statine ralentisse la progression du déclin cognitif et retarde l'âge de survenue d'une démence ou d'une maladie d'Alzheimer chez les patients initialement normaux au plan cognitif (Bettermann et al., 2012). Toutefois, si ces études incluaient des patients porteurs d'au moins un facteur de risque vasculaire, puisque traités par statine, l'existence d'un antécédent d'AVC ischémique n'était pas prise en compte dans les analyses, hormis comme facteur d'ajustement. L'extrapolation de ces résultats aux patients ayant présenté un AVC ischémique paraît donc hasardeuse, la réponse à la question de l'intérêt d'un traitement à long terme ne pourra être donnée que par des études cliniques spécifiques.

CONCLUSION

Nos résultats soulignent l'intérêt de disposer de thérapeutiques à action pléiotrope comme les statines dans l'ischémie cérébrale, grâce à l'impact neuro- et vasculoprotecteur de ces molécules. Nous avons mis en évidence l'amélioration de la récupération fonctionnelle motrice par un traitement post-ischémique par atorvastatine jusqu'à 72 heures après ischémie-reperfusion. Nous avons également démontré l'importance de la protection vasculaire dans cet effet protecteur, et en avons caractérisé différents aspects : la protection de la fonction endothéliale au niveau de l'artère cérébrale moyenne, la préservation de la structure des microvaisseaux et la modulation des interactions entre leucocytes et endothélium. Nous avons également confirmé l'implication du récepteur nucléaire PPAR α , indispensable à la médiation des effets pléiotropes protecteurs des statines dans l'ischémie cérébrale.

Nos résultats viennent étoffer, voire compléter, les données disponibles dans la littérature sur la caractérisation de l'impact d'un traitement par statine dans l'ischémie cérébrale dans le cadre d'un traitement préventif et d'un traitement à la phase aiguë. Ces molécules possèdent un potentiel thérapeutique intéressant. Toutefois, deux points restent à compléter. Une meilleure connaissance de l'impact d'un traitement par statine à la phase aiguë, et plus particulièrement de l'association avec le rtPA, paraît indispensable et permettra notamment d'affiner la connaissance des profils de patients éligibles ou à risque hémorragique majoré. D'autre part, si l'intérêt des statines en prévention secondaire a été bien établi, les données restent limitées concernant les conséquences à long terme de l'ischémie cérébrale, notamment au plan cognitif. C'est dans cet objectif que nous allons évaluer l'impact à long terme (6 mois) d'un traitement post-ischémique chez le rat sur les mécanismes de neurogénèse et de neuroréparation par des techniques de biologie moléculaire, sur l'atrophie hippocampique par un suivi par IRM, et sur la cognition par l'utilisation de tests dédiés. La mise en place d'études, précliniques et cliniques, spécifiquement conçues pour adresser cette problématique, est également nécessaire. Elles permettront d'évaluer si les statines sont responsables d'un bénéfice plus large que la réduction du risque de récurrence, et si elles peuvent effectivement répondre à la définition de médicament à action disease-modifier.

REFERENCES

- Aboa-Eboulé, C., Binquet, C., Jacquin, A., Hervieu, M., Bonithon-Kopp, C., Durier, J., Giroud, M., and Béjot, Y. (2013). Effect of previous statin therapy on severity and outcome in ischemic stroke patients: a population-based study. *J Neurol* 260, 30–37.
- Adam, O., and Laufs, U. (2008). Antioxidative effects of statins. *Arch Toxicol* 82, 885–892.
- Amantea, D., Nappi, G., Bernardi, G., Bagetta, G., and Corasaniti, M.T. (2009). Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J.* 276, 13–26.
- Amarenco, P. (Investigateur principal) (2013). Treat Stroke to Target (TST). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01252875>. Accédé le 17/07/2013.
- Amarenco, P., and Labreuche, J. (2009). Lipid management in the prevention of stroke: review and updated meta-analysis of statins for stroke prevention. *Lancet Neurol* 8, 453–463.
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Callahan, A., Goldstein, L.B., Hennerici, M., Rudolph, A.E., Sillesen, H., Simunovic, L., Szarek, M., Welch, K.M., et al. (2006). High-Dose Atorvastatin after Stroke or Transient Ischemic Attack. *N Engl J Med* 355, 549–559.
- Amin-Hanjani, S., Stagliano, N.E., Yamada, M., Huang, P.L., Liao, J.K., and Moskowitz, M.A. (2001). Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. *Stroke* 32, 980–986.
- Arai, K., Lok, J., Guo, S., Hayakawa, K., Xing, C., and Lo, E.H. (2011). Cellular Mechanisms of Neurovascular Damage and Repair After Stroke. *J. Child Neurol.* 26, 1193–1198.
- Arboix, A., García-Eroles, L., Oliveres, M., Targa, C., Balcells, M., and Massons, J. (2010). Pretreatment with statins improves early outcome in patients with first-ever ischaemic stroke: a pleiotropic effect of statins or a beneficial effect of hypercholesterolemia? *BMC Neurol* 10, 47.
- Arnaboldi, L., and Corsini, A. (2010). Do structural differences in statins correlate with clinical efficacy? *Curr Opin Lipidol* 21, 298–304.
- Asahi, M., Huang, Z., Thomas, S., Yoshimura, S., Sumii, T., Mori, T., Qiu, J., Amin-Hanjani, S., Huang, P., Liao, J., et al. (2005). Protective effects of statins involving both eNOS and tPA in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 722–729.
- Bai, N., Moien-Afshari, F., Washio, H., Min, A., and Laher, I. (2004). Pharmacology of the mouse-isolated cerebral artery. *Vasc. Pharmacol* 41, 97–106.
- Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004). The blood–brain barrier: an overview. *Neurobiol Dis* 16, 1–13.
- Bartolini, A., Vigliani, M., Magrassi, L., Vercelli, A., and Rossi, F. (2011). G-CSF administration to adult mice stimulates the proliferation of microglia but does not modify the outcome of ischemic injury. *Neurobiol Dis* 41, 640–649.
- Baryan, H., Allan, S., Vail, A., and Smith, C. (2012). Systematic review and meta-analysis of the efficacy of statins in experimental stroke. *Int J Stroke* 7, 150–156.

- Bastide, M., Ouk, T., Plaisier, F., Pétrault, O., Stolc, S., and Bordet, R. (2007). Neurogliovascular unit after cerebral ischemia: is the vascular wall a pharmacological target. *Psychoneuroendocrinology* 32, S36–S39.
- Bath, P., Sprigg, N., and England, T. (2013). Colony stimulating factors (including erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and analogues) for stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 6.
- Bath, P.M.W., Gray, L.J., Bath, A.J.G., Buchan, A., Miyata, T., and Green, A.R. (2009). Effects of NXY-059 in experimental stroke: an individual animal meta-analysis. *Br J Pharmacol* 157, 1157–1171.
- Becker, J., Delayre-Orthez, C., Frossard, N., and Pons, F. (2012). The peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate decreases airway reactivity to methacholine and increases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in mouse lung. *Fundam Clin Pharmacol* 26, 340–346.
- Bederson, J.B., Pitts, L.H., Tsuji, M., Nishimura, M.C., Davis, R.L., and Bartkowski, H. (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17, 472–476.
- Bejot, Y., Touzé, E., Jacquin, A., Giroud, M., and Mas, J.L. (2009a). Épidémiologie des accidents vasculaires cérébraux. *Med Sci Paris* 25, 727–732.
- Bejot, Y., Osseby, G.V., Gremeaux, V., Durier, J., Rouaud, O., Moreau, T., and Giroud, M. (2009b). Changes in risk factors and preventive treatments by stroke subtypes over 20 years: A population-based study. *J Neurol Sci* 287, 84–88.
- Benatru, I., Rouaud, O., Durier, J., Contegal, F., Couvreur, G., Bejot, Y., Osseby, G.V., Ben Salem, D., Ricolfi, F., Moreau, T., et al. (2006). Stable Stroke Incidence Rates but Improved Case-Fatality in Dijon, France, From 1985 to 2004. *Stroke* 37, 1674–1679.
- Bérézowski, V., Mysiorek, C., Kuntz, M., Pétrault, O., and Cecchelli, R. (2012). La barrière hémato-encéphalique lors de l'ischémie cérébrale : une cible thérapeutique. *Biol Aujourd'hui* 206, 161–176.
- Berger, C., Xia, F., Schabitz, W., Schwab, S., and Grau, A. (2004). High-dose aspirin is neuroprotective in a rat focal ischemia model. *Brain Res* 998, 237–242.
- Berger, C., Stauder, A., Xia, F., Sommer, C., and Schwab, S. (2008a). Neuroprotection and glutamate attenuation by acetylsalicylic acid in temporary but not in permanent cerebral ischemia. *Exp Neurol* 210, 543–548.
- Berger, C., Xia, F., Maurer, M., and Schwab, S. (2008b). Neuroprotection by pravastatin in acute ischemic stroke in rats. *Brain Res Rev* 58, 48–56.
- Bernaudin, M., Marti, H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E., and Petit, E. (1999). A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 643–651.

- Bettermann, K., Arnold, A., Williamson, J., Rapp, S., Sink, K., Toole, J., Carlson, M., Yasar, S., DeKosky, S., and Burke, G. (2012). Statins, Risk of Dementia, and Cognitive Function: Secondary Analysis of the Ginkgo Evaluation of Memory Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 21, 436–444.
- Béziaud, T., Ru Chen, X., El Shafey, N., Fréchou, M., Teng, F., Palmier, B., Beray-Berthet, V., Soustrat, M., Margail, I., Plotkine, M., et al. (2011). Simvastatin in traumatic brain injury: Effect on brain edema mechanisms. *Crit Care Med* 39, 2300–2307.
- Bhatt, L.K., and Addepalli, V. (2012). Potentiation of aspirin-induced cerebroprotection by minocycline: A therapeutic approach to attenuate exacerbation of transient focal cerebral ischaemia. *Diab Vasc Dis Res* 9, 25–34.
- Biffi, A., Devan, W.J., Anderson, C.D., Cortellini, L., Furie, K.L., Rosand, J., and Rost, N.S. (2011). Statin Treatment and Functional Outcome After Ischemic Stroke: Case-Control and Meta-Analysis. *Stroke* 42, 1314–1319.
- Bordet, R. (Investigateur principal) (2008). Clinical Biological and Pharmacological Factors Influencing Stroke Outcome (Biostroke). <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00763217>. Accédé le 12/07/2013.
- Bordet, R., Deplanque, D., Maboudou, P., Puisieux, F., Pu, Q., Robin, E., Martin, A., Bastide, M., Leys, D., Lhermitte, M., et al. (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.
- Bosch, J., Yusuf, S., Pogue, J., Sleight, P., Lonn, E., Rangoonwala, B., Davies, R., Ostergren, J., and Probstfield, J. (2002). Use of ramipril in preventing stroke: double blind randomised trial. *BMJ* 324, 699.
- Bösel, J., Gandor, F., Harms, C., Synowitz, M., Harms, U., Djoufack, P., Megow, D., Dirnagl, U., Hörtnagl, H., Fink, K., et al. (2005). Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem* 92, 1386–1398.
- Bouet, V., Boulouard, M., Toutain, J., Divoux, D., Bernaudin, M., Schumann-Bard, P., and Freret, T. (2009). The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat Protoc* 4, 1560–1564.
- Bouët, V., Freret, T., Toutain, J., Divoux, D., Boulouard, M., and Schumann-Bard, P. (2007). Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp Neurol* 203, 555–567.
- Brdon, J., Kaiser, S., Hagemann, F., Zhao, Y., Culman, J., and Gohlke, P. (2007). Comparison between early and delayed systemic treatment with candesartan of rats after ischaemic stroke. *J H* 25, 187–196.
- Brott, T., Adams Jr, H.P., Olinger, C.P., Marler, J.R., Barsan, W.G., Biller, J., Spilker, J., Holleran, R., Eberle, R., and Hertzberg, V. (1989). Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 20, 864–870.

- Çakmak, A., Yemişçi, M., Köksoy, C., Yazgan, U., Dinçer, D., and Dalkara, T. (2007). Statin Pre-Treatment Protects Brain Against Focal Cerebral Ischemia in Diabetic Mice. *J Surg Res* 138, 254–258.
- Cappellari, M. (2011). Does statin in the acute phase of ischemic stroke improve outcome after intravenous thrombolysis? A retrospective study. *J Neurol Sci* 308, 128–134.
- Cappellari, M., Bovi, P., Moretto, G., Zini, A., Nencini, P., Sessa, M., Furlan, M., Pezzini, A., Orlandi, G., and Paciaroni, M. (2013). The THRombolysis and STatins (THRaST) study. *Neurology* 80, 655–661.
- Castillo, J., Leira, R., Moro, M.A., Lizasoain, I., Serena, J., and Dávalos, A. (2003). Neuroprotective effects of aspirin in patients with acute cerebral infarction. *Neurosci Lett* 339, 248–250.
- Cathcart, M. (2012). Expression of Concern. *Hypertension* 59, e36–e36.
- Céspedes-Rubio, A., Jurado, F., and Cardona-Gómez, G. (2010). p120 catenin/ α N-catenin are molecular targets in the neuroprotection and neuronal plasticity mediated by atorvastatin after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 88, 3621–3634.
- Chapman, N., Huxley, C., Anderson, M.G., Bousser, M.G., Chalmers, J., Colman, S., Davis, S., Donnan, G., MacMahon, S., Neal, B., et al. (2004). Effects of a Perindopril-Based Blood Pressure-Lowering Regimen on the Risk of Recurrent Stroke According to Stroke Subtype and Medical History: The PROGRESS Trial. *Stroke* 35, 116–121.
- Chen, H., Yoshioka, H., Kim, G.S., Jung, J.E., Okami, N., Sakata, H., Maier, C.M., Narasimhan, P., Goeders, C.E., and Chan, P.H. (2011). Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 14, 1505–1517.
- Chen, J., Zhang, Z.G., Li, Y., Wang, Y., Wang, L., Jiang, H., Zhang, C., Lu, M., Katakowski, M., and Feldkamp, C.S. (2003). Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol* 53, 743–751.
- Chen, J., Zhang, C., Jiang, H., Li, Y., Zhang, L., Robin, A., Katakowski, M., Lu, M., and Chopp, M. (2005). Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 281–290.
- Chen, J., Zacharek, A., Li, A., Zhang, C., Ding, J., Roberts, C., Lu, M., Kapke, A., and Chopp, M. (2006). Vascular endothelial growth factor mediates atorvastatin-induced mammalian achaete-scute homologue-1 gene expression and neuronal differentiation after stroke in retired breeder rats. *Neuroscience* 141, 737–744.
- Chen, J., Zacharek, A., Li, A., Cui, X., Roberts, C., Lu, M., and Chopp, M. (2007). Atorvastatin Promotes Presenilin-1 Expression and Notch1 Activity and Increases Neural Progenitor Cell Proliferation After Stroke. *Stroke* 39, 220–226.
- Chitravas, N., Dewey, H.M., Nicol, M.B., Harding, D.L., Pearce, D.C., and Thrift, A.G. (2007). Is prestroke use of angiotensin-converting enzyme inhibitors associated with better outcome? *Neurology* 68, 1687–1693.

Chu, L., Fang, S., Zhou, Y., Yin, Y., Chen, W., Li, J., Sun, J., Wang, M., Zhang, W., and Wei, E. (2010). Minocycline inhibits 5-lipoxygenase expression and accelerates functional recovery in chronic phase of focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci* 86, 170–177.

Cipolla, M.J. (2009). *The Cerebral Circulation* (San Rafael, CA).

Cipolla, M.J., McCall, A.L., Lessov, N., and Porter, J.M. (1997). Reperfusion decreases myogenic reactivity and alters middle cerebral artery function after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 28, 176–180.

Collino, M., Aragno, M., Mastrocola, R., Benetti, E., Gallicchio, M., Dianzani, C., Danni, O., Thiemermann, C., and Fantozzi, R. (2006). Oxidative stress and inflammatory response evoked by transient cerebral ischemia/reperfusion: Effects of the PPAR- α agonist WY14643. *Free Rad Biol Med* 41, 579–589.

De Cristobal, J., Cardenas, A., Lizasoain, I., Leza, J., Fernandez-Tomé, P., Lorenzo, P., and Moro, M. (2002). Inhibition of Glutamate Release via Recovery of ATP Levels Accounts for a Neuroprotective Effect of Aspirin in Rat Cortical Neurons Exposed to Oxygen-Glucose Deprivation. *Stroke* 33, 261–267.

De Cristóbal, J., Moro, M., Dávalos, A., Castillo, J., Leza, J., Camarero, J., Colado, M.I., Lorenzo, P., and Lizasoain, I. (2001). Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem* 79, 456–459.

Cui, L., Zhang, X., Yang, R., Wang, L., Liu, L., Li, M., and Du, W. (2010). Neuroprotection of early and short-time applying atorvastatin in the acute phase of cerebral ischemia: Down-regulated 12/15-LOX, p38MAPK and cPLA2 expression, ameliorated BBB permeability. *Brain Res* 1325, 164–173.

Daimon, M., Aomi, S., Kawamata, T., and Kurosawa, H. (2004). Pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, reduces delayed neuronal death following transient forebrain ischemia in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett* 362, 122–126.

Dalkara, T., Gursoy-Ozdemir, Y., and Yemisci, M. (2011). Brain microvascular pericytes in health and disease. *Acta Neuropathol* 122, 1–9.

Daneman, R. (2012). The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol* 72, 648–672.

Davignon, J., and Ganz, P. (2004). Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* 109, III–27–III–32.

Deplanque, D., Gelé, P., Pétrault, O., Six, I., Furman, C., Bouly, M., Nion, S., Dupuis, B., Leys, D., Fruchart, J.C., et al. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. *J Neurosci* 23, 6264–6271.

Deplanque, D., Masse, I., Lefebvre, C., Libersa, C., Leys, D., and Bordet, R. (2006). Prior TIA, lipid-lowering drug use, and physical activity decrease ischemic stroke severity. *Neurology* 67, 1403.

- DeVries, A.C., Nelson, R., Traystman, R., and Hurn, P. (2001). Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neurosci Biobehav Rev* 25, 325–342.
- Diener, H.-C., Lees, K.R., Lyden, P., Grotta, J., Davalos, A., Davis, S.M., Shuaib, A., Ashwood, T., Wasiewski, W., Alderfer, V., et al. (2008). NXY-059 for the Treatment of Acute Stroke: Pooled Analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke* 39, 1751–1758.
- Dietel, B., Cicha, I., Kallmünzer, B., Tauchi, M., Yilmaz, A., Daniel, W., Schwab, S., Garlichs, C., and Kollmar, R. (2012). Suppression of dendritic cell functions contributes to the anti-inflammatory action of granulocyte-colony stimulating factor in experimental stroke. *Exp Neurol* 237, 379–387.
- Dirnagl, U. (2012). Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. *Ann N Acad Sci* 1268, 21–25.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391–397.
- Donnan, G., Davis, S., Parsons, M., Ma, H., Dewey, H., and Howells, D. (2011). How to make better use of thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Nat. Rev Neurol* 7, 400–409.
- Donnan, G.A., Fisher, M., Macleod, M., and Davis, S.M. (2008). Stroke. *Lancet* 371, 1612–1623.
- Douiri, A., McKevitt, C., Emmett, E.S., Rudd, A.G., and Wolfe, C.D.A. (2013). Long-Term Effects of Secondary Prevention on Cognitive Function in Stroke Patients. *Circulation sous presse*.
- DREES (2012). L'état de santé de la population en France - Rapport de suivi des objectifs de la loi de santé publique 2011. *Etudes & Résultats* 805, 8.
- Du, Y., Zhang, X., Ji, H., Liu, H., Li, S., and Li, L. (2012). Probucol and atorvastatin in combination protect rat brains in MCAO model: Upregulating Peroxiredoxin2, Foxo3a and Nrf2 expression. *Neurosci Lett* 509, 110–115.
- Dumas, A., and Pouliot, M. (2009). Le neutrophile : ennemi ou ami ? *Med Sci* 25, 699–704.
- Durukan, A., and Tatlisumak, T. (2007). Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87, 179–197.
- Ehrenreich, H., Weissenborn, K., Prange, H., Schneider, D., Weimar, C., Wartenberg, K., Schellinger, P.D., Bohn, M., Becker, H., Wegrzyn, M., et al. (2009). Recombinant Human Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 40, e647–e656.

- Elkind, M. (Investigateur principal) (2010). Neuroprotection with Statin Therapy for Acute Recovery Trial (NeuSTART II). <http://www.strokecenter.org/trials/clinicalstudies/neuroprotection-with-statin-therapy-for-acute-recovery-trial-neu-starta-phase-2-safety-and-pilot-efficacy-study-of-lovastatin-for-the-treatment-of-acute-ischemic-stroke-spotrias/description>. Accédé le 19/07/2013.
- EMA (2006). Slowing the progression of neurodegenerative diseases: medicinal products clinical development. EMA/512562/2006.
- Emerich, D., Dean, R., and Bartus, R. (2002). The Role of Leukocytes Following Cerebral Ischemia: Pathogenic Variable or Bystander Reaction to Emerging Infarct? *Exp Neurol* 173, 168–181.
- Endres, M. (2005). Statins and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 1093–1110.
- Endres, M., Laufs, U., Huang, Z., Nakamura, T., Huang, P., Moskowitz, M.A., and Liao, J.K. (1998). Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci* 95, 8880–8885.
- Engelhorn, T., Goerike, S., Doerfler, A., Okorn, C., Forsting, M., Heusch, G., and Schulz, R. (2004). The Angiotensin II Type 1–Receptor Blocker Candesartan Increases Cerebral Blood Flow, Reduces Infarct Size, and Improves Neurologic Outcome After Transient Cerebral Ischemia in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 467–474.
- Engelhorn, T., Doerfler, A., Heusch, G., and Schulz, R. (2006). Reduction of cerebral infarct size by the AT1-receptor blocker candesartan, the HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin and their combination. *Neurosci Lett* 406, 92–96.
- Engelter, S.T., Soinne, L., Ringleb, P., Sarikaya, H., Bordet, R., Berrouschot, J., Odier, C., Arnold, M., Ford, G.A., and Pezzini, A. (2011). IV thrombolysis and statins. *Neurology* 77, 888–895.
- England, T., Gibson, C., and Bath, P. (2009). Granulocyte-colony stimulating factor in experimental stroke and its effects on infarct size and functional outcome: A systematic review. *Brain Res Rev* 62, 71–82.
- ESO (2009). ESO Guidelines Update - January 2009. http://www.eso-stroke.org/pdf/ESO%20Guidelines_update_Jan_2009.pdf. Accédé le 03/12/2009.
- Esposito, E., Rinaldi, B., Mazzon, E., Donniacuo, M., Impellizzeri, D., Paterniti, I., Capuano, A., Bramanti, P., and Cuzzocrea, S. (2012). Anti-inflammatory effect of simvastatin in an experimental model of spinal cord trauma: involvement of PPAR α . *J Neuroinflamm* 9, 81.
- Fagan, S.C., Hess, D.C., Hohnadel, E.J., Pollock, D.M., and Ergul, A. (2004). Targets for Vascular Protection After Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 35, 2220–2225.
- Fagan, S.C., Waller, J.L., Nichols, F.T., Edwards, D.J., Pettigrew, L.C., Clark, W.M., Hall, C.E., Switzer, J.A., Ergul, A., and Hess, D.C. (2010). Minocycline to Improve Neurologic Outcome in Stroke (MINOS): A Dose-Finding Study. *Stroke* 41, 2283–2287.

- Fan, X., Lo, E.H., and Wang, X. (2013). Effects of Minocycline Plus Tissue Plasminogen Activator Combination Therapy After Focal Embolic Stroke in Type 1 Diabetic Rats. *Stroke* 44, 745–752.
- Ferry-Lemonnier, E., and Comité de pilotage sur la prévention et la prise en charge des AVC (2009). La prévention et la prise en charge des accidents vasculaires cérébraux en France : Rapport à Madame la ministre de la santé et des sports.
- Fisher, M. (2009). Pericyte Signaling in the Neurovascular Unit. *Stroke* 40, S13–S15.
- Fisher, M., and Albers, G. (2013). Advanced imaging to extend the therapeutic time window of acute ischemic stroke. *Ann Neurol* 73, 4–9.
- Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D.W., Hurn, P.D., Kent, T.A., Savitz, S.I., Lo, E.H., and for the STAIR Group (2009). Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations. *Stroke* 40, 2244–2250.
- Flint, A.C., Kamel, H., Navi, B.B., Rao, V.A., Faigles, B.S., Conell, C., Klingman, J.G., Sidney, S., Hills, N.K., Sorel, M., et al. (2012a). Statin Use During Ischemic Stroke Hospitalization Is Strongly Associated With Improved Poststroke Survival. *Stroke* 43, 147–154.
- Flint, A.C., Kamel, H., Navi, B.B., Rao, V.A., Faigles, B.S., Conell, C., Klingman, J.G., Hills, N.K., Nguyen-Huynh, M., and Cullen, S.P. (2012b). Inpatient statin use predicts improved ischemic stroke discharge disposition. *Neurology* 78, 1678–1683.
- Forder, J.P., Munzenmaier, D., and Greene, A. (2005). Angiogenic protection from focal ischemia with angiotensin II type 1 receptor blockade in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H1989–H1996.
- Forstermann, U., and Sessa, W.C. (2011). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33, 829–837.
- Frangogiannis, N.G. (2007). Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost* 97, 738–747.
- Frick, M., Alber, H., Hügel, H., Schwarzacher, S., Pachinger, O., and Weidinger, F. (2002). Short-and long-term changes of flow-mediated vasodilation in patients under statin therapy. *Clin Cardiol* 25, 291–294.
- Fujii, K., Weno, B.L., Baumbach, G.L., and Heistad, D.D. (1992). Effect of antihypertensive treatment on focal cerebral infarction. *Hypertension* 19, 713–716.
- García-Bonilla, L., Campos, M., Giral, D., Salat, D., Chacón, P., Hernández-Guillamon, M., Rosell, A., and Montaner, J. (2012). Evidence for the efficacy of statins in animal stroke models: a meta-analysis. *J Neurochem* 122, 233–243.
- Gautier, S., Ouk, T., Petrucci, O., Caron, J., and Bordet, R. (2009). Neutrophils contribute to intracerebral haemorrhages after treatment with recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol* 156, 673–679.

- Ge, H., Wen, Y., Yang, G., and Betz, A. (2000). Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 in mouse focal cerebral ischemia model. *Chen Med J Engl* 113, 75–79.
- Gelosa, P., Ballerio, R., Banfi, C., Nobili, E., Gianella, A., Pignieri, A., Brioschi, M., Guerrini, U., Castiglioni, L., Blanc-Guillemaud, V., et al. (2010). Terutroban, a Thromboxane/Prostaglandin Endoperoxide Receptor Antagonist, Increases Survival in Stroke-Prone Rats by Preventing Systemic Inflammation and Endothelial Dysfunction: Comparison with Aspirin and Rosuvastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 334, 199–205.
- Gertz, K., Laufs, U., Lindauer, U., Nickenig, G., Bohm, M., Dirnagl, U., and Endres, M. (2003). Withdrawal of Statin Treatment Abrogates Stroke Protection in Mice. *Stroke* 34, 551–557.
- Giannopoulos, S., Katsanos, A., Tsivgoulis, G., and Marshall, R. (2012). Statins and cerebral hemodynamics. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1973–1976.
- Gibson, C., Bath, P., and Murphy, S. (2005). G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 431–439.
- Gidday, J.M., Gasche, Y., Copin, J.C., Shah, A., Perez, R., Shapiro, S., Chan, P., and Park, T. (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.
- Ginsberg, M. (2008). Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. *Neuropharmacology* 55, 363–389.
- Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., et al. (2013). Heart Disease and Stroke Statistics--2013 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 127, e6–e245.
- Goldstein, L.B., Amarenco, P., Zivin, J., Messig, M., Altafullah, I., Callahan, A., Hennerici, M., MacLeod, M.J., Sillesen, H., Zweifler, R., et al. (2009). Statin Treatment and Stroke Outcome in the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) Trial. *Stroke* 40, 3526–3531.
- Goya, K., Sumitani, S., Xu, X., Kitamura, T., Yamamoto, H., Kurebayashi, S., Saito, H., Kouhara, H., Kasayama, S., and Kawase, I. (2004). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Agonists Increase Nitric Oxide Synthase Expression in Vascular Endothelial Cells. *Arter. Thromb Vasc Biol* 24, 658–663.
- Green, A.R. (2008). Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *Br. J. Pharmacol.* 153, S325–S338.
- Groth, W., Blume, A., Gohlke, P., Unger, T., and Culman, J. (2003). Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J Hypertens* 21, 2175–2182.
- Guo, Q., Wang, G., Liu, X., and Namura, S. (2009). Effects of gemfibrozil on outcome after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res* 1279, 121–130.

- Guo, Q., Wang, G., and Namura, S. (2010). Fenofibrate improves cerebral blood flow after middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 70–78.
- Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K.R., Medeghri, Z., Machnig, T., et al. (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359, 1317–1329.
- Hamai, M., Iwai, M., Ide, A., Tomochika, H., Tomono, Y., Mogi, M., and Horiuchi, M. (2006). Comparison of inhibitory action of candesartan and enalapril on brain ischemia through inhibition of oxidative stress. *Neuropharmacology* 51, 822–828.
- Han, J., Kollmar, R., Tobyas, B., and Schwab, S. (2008). Inhibited glutamate release by granulocyte-colony stimulating factor after experimental stroke. *Neurosci Lett* 432, 167–169.
- Hanisch, U., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10, 1387–1394.
- Hanke, M., and Kielian, T. (2011). Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci* 121, 367–387.
- Hawkins, B.T., and Davis, T.P. (2005). The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol Rev* 57, 173–185.
- Hayashi, A., Suzuki, M., Ogawa, Y., Sonoda, R., and Sasamata, M. (2004). Post-stroke atorvastatin treatment reduces neurological deficits and mortality rate in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Pharm Pharmacol* 56, 893–898.
- Hayashi, T., Hamakawa, K., Nagotani, S., Jin, G., Li, F., Deguchi, K., Sehara, Y., Zhang, H., Nagano, I., Shoji, M., et al. (2005). HMG CoA reductase inhibitors reduce ischemic brain injury of Wistar rats through decreasing oxidative stress on neurons. *Brain Res* 1037, 52–58.
- Heiss, W.D. (2012). The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? *Ann N Acad Sci* 1268, 26–34.
- Hennekens, C., and Dalen, J. (2013). Aspirin in the Treatment and Prevention of Cardiovascular Disease: Past and Current Perspectives and Future Directions. *Am J Med* 126, 373–378.
- Hennerici, M., Kern, R., and Szabo, K. (2013). Non-pharmacological strategies for the treatment of acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 12, 572–584.
- Hill, M. (Investigateur principal), and Coutts, S. (Investigateur principal) (2012). TNK-tPA Evaluation for Minor Ischemic Stroke With Proven Occlusion (TEMPO-1). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01654445>. Accédé le 11/07/2013
- Himeda, T., Hayakawa, N., Tounai, H., Sakuma, M., Kato, H., and Araki, T. (2005). Alterations of interneurons of the gerbil hippocampus after transient cerebral ischemia: effect of pitavastatin. *Neuropsychopharmacol* 30, 2014–2025.
- Himeda, T., Tounai, H., Hayakawa, N., and Araki, T. (2007). Postischemic Alterations of BDNF, NGF, HSP 70 and Ubiquitin Immunoreactivity in the Gerbil Hippocampus: Pharmacological Approach. *Cell Mol Neurobiol* 27, 229–250.

- Hjalmarsson, C., Bokemark, L., Manhem, K., Mehlig, K., and Andersson, B. (2012). The Effect of Statins on Acute and Long-Term Outcome After Ischemic Stroke in the Elderly. *Am J Geriatr Pharmacother* 10, 313–322.
- Hoe Heo, J. (Investigateur principal) (2010). Effects of Very Early Use of Rosuvastatin in Preventing Recurrence of Ischemic Stroke (EUREKA). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01364220>. Accédé le 18/07/2013
- Hong, H., Zeng, J.-S., Kreulen, D.L., Kaufman, D.I., and Chen, A.F. (2006). Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H2210–H2215.
- Hosomi, N., Nishiyama, A., Ban, C.R., Naya, T., Takahashi, T., Kohno, M., and Koziol, J.A. (2005). Angiotensin type 1 receptor blockage improves ischemic injury following transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 134, 225–231.
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5, 347–360.
- Inoue, I., Itoh, F., Aoyagi, S., Tazawa, S., Kusama, H., Akahane, M., Mastunaga, T., Hayashi, K., Awata, T., Komoda, T., et al. (2002). Fibrate and Statin Synergistically Increase the Transcriptional Activities of PPAR α /RXR α and Decrease the Transactivation of NF κ B. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 131–139.
- Ito, T., Yamakawa, H., Bregonzio, C., Terron, J.A., Falcon-Neri, A., and Saavedra, J. (2002). Protection Against Ischemia and Improvement of Cerebral Blood Flow in Genetically Hypertensive Rats by Chronic Pretreatment With an Angiotensin II AT1 Antagonist. *Stroke* 33, 2297–2303.
- Iwai, M., Inaba, S., Tomono, Y., Kanno, H., Iwanami, J., Mogi, M., and Horiuchi, M. (2008). Attenuation of Focal Brain Ischemia by Telmisartan, an Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker, in Atherosclerotic Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Hypertens Res* 31, 161–168.
- Iwanami, J., Mogi, M., Tsukuda, K., Min, L.J., Sakata, A., Jing, F., Iwai, M., and Horiuchi, M. (2010). Low dose of telmisartan prevents ischemic brain damage with peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation in diabetic mice. *J H* 28, 1730–1737.
- Jasińska, M., Owczarek, J., and Orszulak-Michalak, D. (2007). Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep* 59, 483–499.
- Jia, L., Chopp, M., Zhang, L., Lu, M., and Zhang, Z. (2010). Erythropoietin in Combination of Tissue Plasminogen Activator Exacerbates Brain Hemorrhage When Treatment Is Initiated 6 Hours After Stroke. *Stroke* 41, 2071–2076.
- Jun, M., Foote, C., Lu, J., Neal, B., Patel, A., Nicholls, S., Grobbee, D., Cass, A., and Perkovic, V. (2010). Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 375, 1875–1884.

- Justicia, C., Panés, J., Solé, S., Cervera, A., Deulofeu, R., Chamorro, A., and Planas, A. (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.
- Kansui, Y., Fujii, K., Goto, K., Abe, I., and Iida, M. (2004). Effects of fluvastatin on endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-mediated relaxations in arteries of hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31, 354–359.
- Kasahara, Y., Taguchi, A., Uno, H., Nakano, A., Nakagomi, T., Hirose, H., Stern, D., and Matsuyama, T. (2010). Telmisartan suppresses cerebral injury in a murine model of transient focal ischemia. *Brain Res* 1340, 70–80.
- Kawada, H., Takizawa, S., Takanashi, T., Morita, Y., Fujita, J., Fukuda, K., Takagi, S., Okano, H., Ando, K., and Hotta, T. (2006). Administration of Hematopoietic Cytokines in the Subacute Phase After Cerebral Infarction Is Effective for Functional Recovery Facilitating Proliferation of Intrinsic Neural Stem/Progenitor Cells and Transition of Bone Marrow-Derived Neuronal Cells. *Circulation* 113, 701–710.
- Kawai, H., Deguchi, S., Deguchi, K., Yamashita, T., Ohta, Y., Shang, J., Tian, F., Zhang, X., Liu, N., Liu, W., et al. (2011a). Synergistic benefit of combined amlodipine plus atorvastatin on neuronal damage after stroke in Zucker metabolic rat. *Brain Res* 1368, 317–323.
- Kawai, H., Deguchi, S., Deguchi, K., Yamashita, T., Ohta, Y., Omote, Y., Kurata, T., Ikeda, Y., Matsuura, T., and Abe, K. (2011b). Protection against ischemic stroke damage by synergistic treatment with amlodipine plus atorvastatin in Zucker metabolic rat. *Brain Res* 1382, 308–314.
- Kawashima, S., Yamashima, T., Miwa, Y., Ozaki, M., Namiki, M., Hirase, T., Inoue, N., Hirata, K., and Yokoyama, M. (2003). HMG-CoA Reductase Inhibitor Has Protective Effects Against Stroke Events in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Stroke* 34, 157–163.
- Khatri, R., McKinney, A., Swenson, B., and Janardhan, V. (2012). Blood–brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Neurology* 79, S52–S57.
- Khayyam, N., Thavendiranathan, P., Carmichael, F.J., Kus, B., Jay, V., and Burnham, W. (1999). Neuroprotective effects of acetylsalicylic acid in an animal model of focal brain ischemia. *Neuroreport* 10, 371–374.
- Kilic, E., Kilic, U., Matter, C., Luscher, T., Bassetti, C., and Hermann, D. (2005a). 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* 36, 332–336.

- Kilic, U., Bassetti, C.L., Kilic, E., Xing, H., Wang, Z., and Hermann, D.M. (2005b). 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* 134, 901–906.
- Kim, B., Kim, M., Park, J., Lee, S., Kim, Y., Ryu, S., Kim, Y., and Yoon, B. (2009). Reduced neurogenesis after suppressed inflammation by minocycline in transient cerebral ischemia in rat. *J Neurol Sci* 279, 70–75.
- Kim, H., Sawada, N., Soydan, G., Lee, H., Zhou, Z., Hwang, S., Waeber, C., Moskowitz, M., and Liao, J. (2008). Additive effects of statin and dipyridamole on cerebral blood flow and stroke protection. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1285–1293.
- Kim, J., Song, T., Park, J., Lee, H., Nam, C., Nam, H., Kim, Y., and Heo, J. (2012). Different prognostic value of white blood cell subtypes in patients with acute cerebral infarction. *Atherosclerosis* 222, 464–467.
- Kleikers, P., Wingler, K., Hermans, J., Diebold, I., Altenhöfer, S., Radermacher, K., Janssen, B., Görlach, A., and Schmidt, H. (2012). NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. *J Mol Med* 90, 1391–1406.
- Koehler, R., Roman, R., and Harder, D. (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci* 32, 160–169.
- Kohler, E., Prentice, D.A., Bates, T.R., Hankey, G.J., Claxton, A., van Heerden, J., and Blacker, D. (2013). Intravenous Minocycline in Acute Stroke: A Randomized, Controlled Pilot Study and Meta-Analysis. *Stroke sous presse*.
- Koistinaho, M., Malm, T., Kettunen, M., Goldsteins, G., Starckx, S., Kauppinen, R., Opdenakker, G., and Koistinaho, J. (2005). Minocycline protects against permanent cerebral ischemia in wild type but not in matrix metalloprotease-9-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 460–467.
- Kokubo, Y. (2012). Traditional risk factor management for stroke. *Curr Opin Neurol* 25, 11–17.
- Kollmar, R., Henninger, N., Urbanek, C., and Schwab, S. (2010). Research G-CSF, rt-PA and combination therapy after experimental thromboembolic stroke. *Exp Transl. Stroke Med* 9, 13.
- Komine-Kobayashi, M., Zhang, N., Liu, M., Tanaka, R., Hara, H., Osaka, A., Mochizuki, H., Mizuno, Y., and Urabe, T. (2005). Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 402–413.
- Kozak, A., Ergul, A., El-Remessy, A.B., Johnson, M.H., Machado, L.S., Elewa, H.F., Abdelsaid, M., Wiley, D.C., and Fagan, S.C. (2009). Candesartan Augments Ischemia-Induced Proangiogenic State and Results in Sustained Improvement After Stroke. *Stroke* 40, 1870–1876.

- Krikov, M., Thone-Reineke, C., Müller, S., Villringer, A., and Unger, T. (2008). Candesartan but not ramipril pretreatment improves outcome after stroke and stimulates neurotrophin BDNF/TrkB system in rats. *J Hypertens* 26, 544–552.
- Kumagai, R., Oki, C., Muramatsu, Y., Kurosaki, R., Kato, H., and Araki, T. (2004). Pitavastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, reduces hippocampal damage after transient cerebral ischemia in gerbils. *J Neural Transm* 111.
- Von Kummer, R., Albers, G., Mori, E., and DIAS Steering Committees (2012). The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke (DIAS) clinical trial program. *Int J Stroke* 7, 589–596.
- Lakhan, S.E., Bagchi, S., and Hofer, M. (2010). Statins and clinical outcome of acute ischemic stroke: a systematic review. *Int Arch Med* 3, 22.
- Lampl, Y., Boaz, M., Gilad, R., Lorberboym, M., Dabby, R., Rapoport, A., Anca-Hershkowitz, M., and Sadeh, M. (2007). Minocycline treatment in acute stroke An open-label, evaluator-blinded study. *Neurology* 69, 1404–1410.
- Lan, X., Qu, H., Yao, W., and Zhang, C. (2008). Granulocyte-colony stimulating factor inhibits neuronal apoptosis in a rat model of diabetic cerebral ischemia. *Tohoku J Exp Med* 216, 117–126.
- Lansberg, M.G., Albers, G.W., and Wijman, C. (2007). Symptomatic Intracerebral Hemorrhage following Thrombolytic Therapy for Acute Ischemic Stroke: A Review of the Risk Factors. *Cerebrovasc Dis* 24, 1–10.
- Lapchak, P., and Han, M. (2009). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin reduces thrombolytic-induced intracerebral hemorrhage in embolized rabbits. *Brain Res* 1303, 144–150.
- Larrue, V., Amarenco, P., Caussanel, J.P., Ducrocq, X., Lucas, C., Mahagne, M.H., Rouanet, F., Baron, J.C., Baumelou, B., Boulliat, J., et al. (2000). Recommandations pour l'utilisation du traitement thrombolytique intraveineux dans l'accident ischémique cérébral - Société Française Neurovasculaire. *Rev Neurol Paris* 1178–1185.
- Laufs, U., Gertz, K., Huang, P., Nickenig, G., Böhm, M., Dirnagl, U., and Endres, M. (2000a). Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31, 2442–2449.
- Laufs, U., Endres, M., Stagliano, N., Amin-Hanjani, S., Chui, D., Yang, S., Simoncini, T., Yamada, M., Rabkin, E., and Allen, P. (2000b). Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 106, 15–24.
- Laufs, U., Gertz, K., Dirnagl, U., Böhm, M., Nickenig, G., and Endres, M. (2002). Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res* 942, 23–30.

- Lee, R., M Channon, K., and Antoniades, C. (2012). Therapeutic strategies targeting endothelial function in humans: clinical implications. *Curr Vasc. Pharmacol* 10, 77–93.
- Lee, S., Chu, K., Jung, K., Ko, S., Kim, E., Sinn, D., Lee, Y., Lo, E., Kim, M., and Roh, J. (2005). Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1058, 120–128.
- Lee, S., Kim, Y., Kim, Y., and Yoon, B. (2008). Atorvastatin enhances hypothermia-induced neuroprotection after stroke. *J Neurol Sci* 275, 64–68.
- Lees, K.R., Bluhmki, E., von Kummer, R., Brott, T.G., Toni, D., Grotta, J.C., Albers, G.W., Kaste, M., Marler, J.R., Hamilton, S.A., et al. (2010). Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* 375, 1695–1703.
- Li, J., and McCullough, L. (2009). Sex differences in minocycline-induced neuroprotection after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 670–674.
- Li, Y., Lu, Z., Keogh, C., Yu, S., and 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.
- Liebetrau, M., Burggraf, D., Wunderlich, N., Jäger, G., Linz, W., and Hamann, G. (2005). ACE inhibition reduces activity of the plasminogen/plasmin and MMP systems in the brain of spontaneous hypertensive stroke-prone rats. *Neurosci Lett* 376, 205–209.
- Liu, F., and McCullough, L. (2012). Interactions between age, sex, and hormones in experimental ischemic stroke. *Neurochem Int* 61, 1255–1265.
- Liu, S., Lee, S., Lee, H., Liu, D., Wang, H., Liu, R., Lin, S., and Shyu, W. (2010). Granulocyte Colony-Stimulating Factor Activating HIF-1 α Acts Synergistically with Erythropoietin to Promote Tissue Plasticity. *PLoS ONE* 5, e10093.
- Liu, X., Zhang, Z., Zhang, L., Morris, D., Kapke, A., Lu, M., and Chopp, M. (2006). Atorvastatin downregulates tissue plasminogen activator-aggravated genes mediating coagulation and vascular permeability in single cerebral endothelial cells captured by laser microdissection. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 787–796.
- Liu, Z., Fan, Y., Won, S.J., Neumann, M., Hu, D., Zhou, L., Weinstein, P.R., and Liu, J. (2007). Chronic Treatment With Minocycline Preserves Adult New Neurons and Reduces Functional Impairment After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 38, 146–152.
- Lok, J., Gupta, P., Guo, S., Kim, W., Whalen, M., van Leyen, K., and Lo, E. (2007). Cell–cell Signaling in the Neurovascular Unit. *Neurochem Res* 32, 2032–2045.
- Lou, M., Blume, A., Zhao, Y., Gohlke, P., Deuschl, G., Herdegen, T., and Culman, J. (2004). Sustained blockade of brain AT1 receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis, and inflammatory responses in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 536–547.

- Luissint, A.C., Artus, C., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., and Couraud, P.O. (2012). Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 9, 23.
- Lundbeck (2008). Efficacy and Safety Study of Desmoteplase to Treat Acute Ischemic Stroke (DIAS-3). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00790920>. Accédé le 11/07/2013.
- Lundbeck (2009). Efficacy and Safety Study of Desmoteplase to Treat Acute Ischemic Stroke (DIAS-4). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00856661>. Accédé le 11/07/2013.
- Lundbeck (2010). Clinical Study of Desmoteplase in Japanese Patients With Acute Ischemic Stroke (DIAS-J). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01104467>. Accédé le 11/07/2013.
- Machado, L.S., Sazonova, I.Y., Kozak, A., Wiley, D.C., El-Remessy, A.B., Ergul, A., Hess, D.C., Waller, J.L., and Fagan, S.C. (2009). Minocycline and Tissue-Type Plasminogen Activator for Stroke: Assessment of Interaction Potential. *Stroke* 40, 3028–3033.
- Macleod, M.R., O'Collins, T., Howells, D., and Donnan, G. (2004). Pooling of Animal Experimental Data Reveals Influence of Study Design and Publication Bias. *Stroke* 35, 1203–1208.
- Macrez, R., Ali, C., Toutirais, O., Le Mauff, B., Defer, G., Dirnagl, U., and Vivien, D. (2011). Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol* 10, 471–480.
- Mariucci, G., Taha, E., Tantucci, M., Spaccatini, C., Tozzi, A., and Ambrosini, M.. (2011). Intravenous administration of pravastatin immediately after middle cerebral artery occlusion reduces cerebral oedema in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 660, 381–386.
- Martinez-Ramirez, S., Delgado-Mederos, R., Marín, R., Suárez-Calvet, M., Sáinz, M.P., Alejandre, A., Vidal-Jordana, Á., Martí-Vilalta, J.L., and Martí-Fàbregas, J. (2012). Statin pretreatment may increase the risk of symptomatic intracranial haemorrhage in thrombolysis for ischemic stroke: results from a case–control study and a meta-analysis. *J Neurol* 259, 111–118.
- Matchett, G., Calinisan, J., Matchett, G., Martin, R., and Zhang, J. (2007). The effect of granulocyte-colony stimulating factor in global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1136, 200–207.
- Mayanagi, K., Katakam, P.V., Gáspár, T., Domoki, F., and Busija, D.W. (2008). Acute treatment with rosuvastatin protects insulin resistant (C57BL/6J ob/ob) mice against transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1927–1935.
- McKinney, J.S., and Kostis, W.J. (2012). Statin Therapy and the Risk of Intracerebral Hemorrhage: A Meta-Analysis of 31 Randomized Controlled Trials. *Stroke* 43, 2149–2156.
- Mergenthaler, P., and Meisel, A. (2012). Do stroke models model stroke? *Dis Model Mech* 5, 718–725.

- Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J.P., Chatterjee, V.K., Glass, C.K., Gonzalez, F.J., Grimaldi, P.A., Kadowaki, T., Lazar, M.A., O’Rahilly, S., et al. (2006). International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev* 58, 726–741.
- Minnerup, J., and Schäbitz, W.R. (2009). Multifunctional actions of approved and candidate stroke drugs. *Neurotherapeutics* 6, 43–52.
- Minnerup, J., Heidrich, J., Wellmann, J., Rogalewski, A., Schneider, A., and Schabitz, W.-R. (2008). Meta-Analysis of the Efficacy of Granulocyte-Colony Stimulating Factor in Animal Models of Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 39, 1855–1861.
- Minnerup, J., Heidrich, J., Rogalewski, A., Schabitz, W.-R., and Wellmann, J. (2009). The Efficacy of Erythropoietin and Its Analogues in Animal Stroke Models: A Meta-Analysis. *Stroke* 40, 3113–3120.
- Minnerup, J., Sutherland, B., Buchan, A., and Kleinschnitz, C. (2012). Neuroprotection for Stroke: Current Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 13, 11753–11772.
- Molina, C.A. (2011). Reperfusion Therapies for Acute Ischemic Stroke: Current Pharmacological and Mechanical Approaches. *Stroke* 42, S16–S19.
- Montaner, J. (Investigateur principal) (2012). Stroke Treatment With Acute Reperfusion and Simvastatin (STARS07). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01073007>. Accédé le 19/07/2013.
- Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S., and Ceru, M.. (2004). Immunolocalization of Peroxisome Proliferator Activated Receptors and Retinoid X Receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123, 131–145.
- Moro, M.A., De Alba, J., Cardenas, A., De Cristobal, J., Leza, J.C., Lizasoain, I., Diaz-Guerra, M.J.M., Bosca, L., and Lorenzo, P. (2000). Mechanisms of the neuroprotective effect of aspirin after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Neuropharmacol* 39, 1309–1318.
- Moskowitz, M.A., Lo, E.H., and Iadecola, C. (2010). The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. *Neuron* 67, 181–198.
- Muir, K. (Investigateur principal) (2011). Alteplase-Tenecteplase Trial Evaluation for Stroke Thrombolysis (ATTEST). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01472926>. Accédé le 11/07/2013.
- Murata, Y., Rosell, A., Scannevin, R.H., Rhodes, K.J., Wang, X., and Lo, E.H. (2008). Extension of the Thrombolytic Time Window With Minocycline in Experimental Stroke. *Stroke* 39, 3372–3377.
- Mysiorek, C., Culot, M., Dehouck, P., Derudas, B., Staels, B., Bordet, R., Cecchelli, R., Fenart, L., and Bérézowski, V. (2009). Peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha activation protects brain capillary endothelial cells from oxygen glucose deprivation-induced hyperpermeability in the blood-brain barrier. *Curr Neurovasc Res* 6, 181–193.

- Nagotani, S., Hayashi, T., Sato, K., Zhang, W., Deguchi, K., Nagano, I., Shoji, M., and Abe, K. (2005). Reduction of Cerebral Infarction in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats by Statins Associated With Amelioration of Oxidative Stress. *Stroke* 36, 670–672.
- Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S. (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26, 523–530.
- Ni Chroinin, D., Asplund, K., Asberg, S., Callaly, E., Cuadrado-Godia, E., Diez-Tejedor, E., Di Napoli, M., Engelter, S.T., Furie, K.L., Giannopoulos, S., et al. (2013). Statin Therapy and Outcome After Ischemic Stroke: Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies and Randomized Trials. *Stroke* 44, 448–456.
- O'Collins, V., Macleod, M., Cox, S., Van Raay, L., Aleksoska, E., Donnan, G., and Howells, D. (2011). Preclinical drug evaluation for combination therapy in acute stroke using systematic review, meta-analysis, and subsequent experimental testing. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 962–975.
- O'Collins, V.E., Macleod, M.R., Donnan, G.A., Horky, L.L., van der Worp, B.H., and Howells, D.W. (2006). 1,026 Experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 59, 467–477.
- Okamoto, K., Takai, S., Sasaki, S., and Miyazaki, M. (2002). Trandolapril Reduces Infarction Area after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Hypertens Res* 25, 583–588.
- Omura-Matsuoka, E., Yagita, Y., Sasaki, T., Terasaki, Y., Oyama, N., Sugiyama, Y., Okazaki, S., Sakoda, S., and Kitagawa, K. (2009). Postischemic administration of angiotensin II type 1 receptor blocker reduces cerebral infarction size in hypertensive rats. *Hypertens Res* 32, 548–553.
- Ouk, T., Laprais, M., Bastide, M., Mostafa, K., Gautier, S., and Bordet, R. (2009). Withdrawal of fenofibrate treatment partially abrogates preventive neuroprotection in stroke via loss of vascular protection. *Vasc. Pharmacol* 51, 323–330.
- Pahan, K., Sheikh, F., Namboodiri, A.M., and Singh, I. (1997). Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest* 100, 2671–2678.
- Palomares, S.M., and Cipolla, M.J. (2011). Vascular Protection Following Cerebral Ischemia and Reperfusion. *J Neurol Neurophysiol* S1.
- Pannasch, U., and Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci* 36, 405–417.
- Parsons, M., Spratt, N., Bivard, A., Campbell, B., Chung, K., Miteff, F., O'Brien, B., Bladin, C., McElduff, P., and Allen, C. (2012). A randomized trial of tenecteplase versus alteplase for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 366, 1099–1107.
- Paumelle, R., and Staels, B. (2008). Cross-talk between statins and PPARalpha in cardiovascular diseases: clinical evidence and basic mechanisms. *Trends Cardiovasc Med* 18, 73–78.

Paumelle, R., Blanquart, C., Briand, O., Barbier, O., Duhem, C., Woerly, G., Percevault, F., Fruchart, J.C., Dombrowicz, D., Glineur, C., et al. (2006). Acute Antiinflammatory Properties of Statins Involve Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha via Inhibition of the Protein Kinase C Signaling Pathway. *Circ Res* 98, 361–369.

Paxinos, G., and Franklin, K. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition (Academic Press).

Pérez de la Ossa, N., Millán, M., Arenillas, J.F., Sánchez-Ojanguren, J., Palomeras, E., Dorado, L., Guerrero, C., and Dávalos, A. (2009). Influence of direct admission to Comprehensive Stroke Centers on the outcome of acute stroke patients treated with intravenous thrombolysis. *J Neurol* 256, 1270–1276.

Pétrault, O., Ouk, T., Gautier, S., Laprais, M., Gelé, P., Bastide, M., and 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.

Philip, M., Benatar, M., Fisher, M., and Savitz, S.I. (2009). Methodological Quality of Animal Studies of Neuroprotective Agents Currently in Phase II/III Acute Ischemic Stroke Trials. *Stroke* 40, 577–581.

Popa-Wagner, A., Stocker, K., Balseanu, A.T., Rogalewski, A., Diederich, K., Minnerup, J., Margaritescu, C., and Schabitz, W.R. (2010). Effects of Granulocyte-Colony Stimulating Factor After Stroke in Aged Rats. *Stroke* 41, 1027–1031.

Porritt, M., Chen, M., Rewell, S., Dean, R., Burrell, L., and Howells, D. (2010). ACE inhibition reduces infarction in normotensive but not hypertensive rats: correlation with cortical ACE activity. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 1520–1526.

Prabhakaran, S., O'Neill, K., Stein-Spencer, L., Walter, J., and Alberts, M. (2013). Prehospital Triage to Primary Stroke Centers and Rate of Stroke Thrombolysis. *JAMA Neurol* *sous presse*, 1–7.

Prinz, V., and Endres, M. (2009). The Acute (Cerebro)Vascular Effects of Statins. *Anesth Analg* 109, 572–584.

Prinz, V., Laufs, U., Gertz, K., Kronenberg, G., Balkaya, M., Leithner, C., Lindauer, U., and Endres, M. (2008). Intravenous Rosuvastatin for Acute Stroke Treatment: An Animal Study. *Stroke* 39, 433–438.

PROGRESS Collaborative Group (2001). Randomised trial of perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet* 358, 1033–1041.

Qi, C., Zhu, Y., and Reddy, J. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. *Cell Biochem Biophys* 32, 187–204.

Ravati, A., Junker, V., Kouklei, M., Ahlemeyer, B., Culmsee, C., and Kriegelstein, J. (1999). Enalapril and moexipril protect from free radical-induced neuronal damage in vitro and reduce ischemic brain injury in mice and rats. *Eur J Pharmacol* 373, 21–33.

- Rinaldi, B., Donniacuo, M., Esposito, E., Capuano, A., Sodano, L., Mazzon, E., Di Palma, D., Paterniti, I., Cuzzocrea, S., and Rossi, F. (2011). PPAR α mediates the anti-inflammatory effect of simvastatin in an experimental model of zymosan-induced multiple organ failure. *Br J Pharmacol* 163, 609–623.
- Ringelstein, E.B., Thijs, V., Norrving, B., Chamorro, A., Aichner, F., Grond, M., Saver, J., Laage, R., Schneider, A., Rathgeb, F., et al. (2013). Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients With Acute Ischemic Stroke: Results of the AX200 for Ischemic Stroke Trial. *Stroke sous presse*.
- Rouviere, H., Delmas, A., and Delmas, V. (2002). *Anatomie humaine : descriptive, topographique et fonctionnelle. Tome IV, Système nerveux central, voies et centres nerveux.* (Masson).
- Sadamoto, Y., Igase, K., Sakanaka, M., Sato, K., Otsuka, H., Sakaki, S., Masuda, S., and Sasaki, R. (1998). Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 26–32.
- Sanset, E., Bath, P., Boysen, G., Jatuzis, D., Korv, J., Luders, S., Murray, G., Richter, P., Roine, R., Terent, A., et al. (2011). The angiotensin-receptor blocker candesartan for treatment of acute stroke (SCAST): a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet* 377, 741–750.
- Sawada, T., Yamada, H., Dahlof, B., Matsubara, H., and for the KYOTO HEART Study Group (2009). Effects of valsartan on morbidity and mortality in uncontrolled hypertensive patients with high cardiovascular risks: KYOTO HEART Study. *Eur Heart J* 30, 2461–2469.
- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (1994). Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344, 1383–1389.
- Schabitz, W.-R., Kollmar, R., Schwaninger, M., Juettler, E., Bardutzky, J., Schölzke, M., Sommer, C., and Schwab, S. (2003). Neuroprotective Effect of Granulocyte Colony-Stimulating Factor After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 34, 745–751.
- Schrader, J., Luders, S., Kulschewski, A., Hammersen, F., Plate, K., Berger, J., Zidek, W., Dominiak, P., Diener, H.C., and the MOSES Study Group (2005). Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared With Nitrendipine for Secondary Prevention: Principal Results of a Prospective Randomized Controlled Study (MOSES). *Stroke* 36, 1218–1224.
- Schupp, M., Janke, J., Clasen, R., Unger, T., and Kintscher, U. (2004). Angiotensin Type 1 Receptor Blockers Induce Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Activity. *Circulation* 109, 2054–2057.
- Schwab, S. (2013). Cooling Plus Best Medical Treatment Versus Best Medical Treatment Alone for Acute Ischaemic Stroke (EuroHYP-1). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01833312>. Accédé le 24/08/2013.

- Sehara, Y., Hayashi, T., Deguchi, K., Zhang, H., Tsuchiya, A., Yamashita, T., Lukic, V., Nagai, M., Kamiya, T., and Abe, K. (2007). Potentiation of neurogenesis and angiogenesis by G-CSF after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1151, 142–149.
- Shabanzadeh, A., Shuaib, A., and Wang, C. (2005). Simvastatin reduced ischemic brain injury and perfusion deficits in an embolic model of stroke. *Brain Res* 1042, 1–5.
- Shehadah, A., Chen, J., Cui, X., Roberts, C., Lu, M., and Chopp, M. (2010). Combination treatment of experimental stroke with Niaspan and Simvastatin, reduces axonal damage and improves functional outcome. *J Neurol Sci* 294, 107–111.
- Shimamura, M., Sato, N., Sata, M., Kurinami, H., Takeuchi, D., Wakayama, K., Hayashi, T., Iida, H., and Morishita, R. (2007). Delayed Postischemic Treatment With Fluvastatin Improved Cognitive Impairment After Stroke in Rats. *Stroke* 38, 3251–3258.
- Shin, H.K., Dunn, A., Jones, P., Boas, D., Moskowitz, M., and Ayata, C. (2006). Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 1018–1030.
- Shiraishi, J., Sawada, T., Koide, M., Yamada, H., and Matsubara, H. (2012). Cardio-Cerebrovascular Protective Effects of Valsartan in High-Risk Hypertensive Patients With Coronary Artery Disease (from the Kyoto Heart Study). *Am J Cardiol* 109, 1308–1314.
- Sierra, S., Ramos, M.C., Molina, P., Esteo, C., Vázquez, J.A., and Burgos, J. (2011). Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood-brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death. *J Alzheimers Dis* 23, 307–318.
- Singh, R. (Investigateur principal) (2012). Neuroprotection With Minocycline Therapy for Acute Stroke Recovery Trial (NeuMAST). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00930020>. Accédé le 13/07/2013.
- Sirén, A., Fratelli, M., Brines, M., Goemans, C., Casagrande, S., Lewczuk, P., Keenan, S., Gleiter, C., Pasquali, C., and Capobianco, A. (2001). Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci* 98, 4044–4049.
- Sironi, L., Cimino, M., Guerrini, U., Calvio, A., Lodetti, B., Asdente, M., Balduini, W., Paoletti, R., and Tremoli, E. (2003). Treatment With Statins After Induction of Focal Ischemia in Rats Reduces the Extent of Brain Damage. *Arter. Thromb Vasc Biol* 23, 322–327.
- Sironi, L., Gianazza, E., Gelosa, P., Guerrini, U., Nobili, E., Gianella, A., Cremonesi, B., Paoletti, R., and Tremoli, E. (2005). Rosuvastatin, but not Simvastatin, Provides End-Organ Protection in Stroke-Prone Rats by Antiinflammatory Effects. *Arter. Thromb Vasc Biol* 25, 598–603.
- Sironi, L., Banfi, C., Brioschi, M., Gelosa, P., Guerrini, U., Nobili, E., Gianella, A., Paoletti, R., Tremoli, E., and Cimino, M. (2006). Activation of NF- κ B and ERK1/2 after permanent focal ischemia is abolished by simvastatin treatment. *Neurobiol Dis* 22, 445–451.

- Six, I., Gasan, G., Mura, E., and Bordet, R. (2003). Beneficial effect of pharmacological mobilization of bone marrow in experimental cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 458, 327–328.
- Sofroniew, M., and Vinters, H. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7–35.
- Solaroglu, I., Tsubokawa, T., Cahill, J., and Zhang, J.H. (2006). Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience* 143, 965–974.
- Spence, J. (2010). Secondary stroke prevention. *Nat Rev Neurol* 6, 477–486.
- Strbian, D., Michel, P., Ringleb, P., Numminen, H., Breuer, L., Bodenant, M., Seiffge, D.J., Jung, S., Obach, V., Weder, B., et al. (2013). Relationship Between Onset-to-Door Time and Door-to-Thrombolysis Time: A Pooled Analysis of 10 Dedicated Stroke Centers. *Stroke sous presse*.
- Strecker, J., Sevimli, S., Schilling, M., Klocke, R., Nikol, S., Schneider, A., and Schäbitz, W. (2010). Effects of G-CSF treatment on neutrophil mobilization and neurological outcome after transient focal ischemia. *Exp Neurol* 222, 108–113.
- Stroke Unit Trialists' Collaboration (2007). Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. *Cochrane Database Syst Rev* CD000197.
- Sugiura, S., Yagita, Y., Sasaki, T., Todo, K., Terasaki, Y., Ohyama, N., Hori, M., and Kitagawa, K. (2007). Postischemic administration of HMG CoA reductase inhibitor inhibits infarct expansion after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1181, 125–129.
- Suh, J., Choi, D., Chang, H., Cho, Y., Youn, T., Chae, I., Kim, K., Kim, C., Kim, H., Oh, B., et al. (2010). HMG-CoA Reductase Inhibitor Improves Endothelial Dysfunction in Spontaneous Hypertensive Rats Via Down-regulation of Caveolin-1 and Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *J Kor Med Sci* 25, 16–23.
- Sutherland, B.A., Minnerup, J., Balami, J.S., Arba, F., Buchan, A.M., and Kleinschnitz, C. (2012). Neuroprotection for ischaemic stroke: Translation from the bench to the bedside. *Int. J. Stroke* 7, 407–418.
- Taguchi, A., Wen, Z., Myojin, K., Yoshihara, T., Nakagomi, T., Nakayama, D., Tanaka, H., Soma, T., Stern, D., Naritomi, H., et al. (2007). Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model. *Eur J Neurosci* 26, 126–133.
- Tanaka, H., Takai, S., Furubayashi, K., Inoue, N., Kajimoto, Y., Miyatake, S., Kuroiwa, T., and Miyazaki, M. (2007a). Inhibition of Matrix Metalloproteinase-9 Activity by Trandolapril after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Hypertens Res* 30, 469–475.
- Tanaka, N., Katayama, Y., Katsumata, T., Otori, T., and Nishiyama, Y. (2007b). Effects of long-term administration of HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, on stroke events and local cerebral blood flow in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1169, 125–132.

Taylor, F., Ward, K., Moore, T.H., Burke, M., and Davey, S.G. (2013). Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 1, CD004816.

The European Register of Stroke (EROS) Investigators (2009). Incidence of Stroke in Europe at the Beginning of the 21st Century. *Stroke* 40, 1557–1563.

The IST-3 collaborative group (2012). The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): a randomised controlled trial. *Lancet* 379, 2352–2363.

Tringali, G., Vairano, M., Dello Russo, C., Preziosi, P., and Navarra, P. (2004). Lovastatin and mevastatin reduce basal and cytokine-stimulated production of prostaglandins from rat microglial cells in vitro: evidence for a mechanism unrelated to the inhibition of hydroxymethyl-glutaryl CoA reductase. *Neurosci Lett* 354, 107–110.

Trinkl, A., Vosko, M., Wunderlich, N., Dichgans, M., and Hamann, G. (2006). Pravastatin reduces microvascular basal lamina damage following focal cerebral ischemia and reperfusion. *Eur J Neurosci* 24, 520–526.

Trompet, S., Vliet, P., Craen, A., Jolles, J., Buckley, B., Murphy, M., Ford, I., Macfarlane, P., Sattar, N., Packard, C., et al. (2010). Pravastatin and cognitive function in the elderly. Results of the PROSPER study. *J Neurol* 257, 85–90.

Tsukuda, K., Mogi, M., Iwanami, J., Min, L.-J., Jing, F., Oshima, K., and Horiuchi, M. (2011). Irbesartan attenuates ischemic brain damage by inhibition of MCP-1/CCR2 signaling pathway beyond AT1 receptor blockade. *Biochem Biophys Res Commun* 409, 275–279.

Tsunekawa, T., Hayashi, T., Kano, H., Sumi, D., Matsui-Hirai, H., Thakur, N.K., Egashira, K., and Iguchi, A. (2001). Cerivastatin, a Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitor, Improves Endothelial Function in Elderly Diabetic Patients Within 3 Days. *Circulation* 104, 376–379.

Uddin, G., Hussain, M., Wang, C., Todd, K., and Shuaib, A. (2003). Acetylsalicylic acid reduces perfusion deficit in ischemic injured brain in rats. *Neuroreport* 14, 1753–1755.

Villa, P., Bigini, P., Mennini, T., Agnello, D., Laragione, T., Cagnotto, A., Viviani, B., Marinovich, M., Cerami, A., Coleman, T.R., et al. (2003). Erythropoietin Selectively Attenuates Cytokine Production and Inflammation in Cerebral Ischemia by Targeting Neuronal Apoptosis. *J Exp Med* 198, 971–975.

Wakai, T., Yoshioka, H., Yagi, T., Kato, T., and Kinouchi, H. (2011). Effects of valsartan on neuroprotection and neurogenesis after ischemia. *NeuroReport* 22, 385–390.

Wang, G., and Namura, S. (2011). Effects of chronic systemic treatment with peroxisome proliferator-activated receptor α activators on neuroinflammation induced by intracerebral injection of lipopolysaccharide in adult mice. *Neurosci Res* 70, 230–237.

Wang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R., and Chopp, M. (2004). Treatment of Stroke With Erythropoietin Enhances Neurogenesis and Angiogenesis and Improves Neurological Function in Rats. *Stroke* 35, 1732–1737.

- Wang, L., Zhang, X., Liu, L., Yang, R., Cui, L., and Li, M. (2010). Atorvastatin protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates HMGB1, HMGB1 receptors (RAGE and TLR4), NF- κ B expression. *Neurosci Lett* 471, 152–156.
- Wang, S., Lee, S., Guo, S., Montaner, J., Wang, X., and Lo, E. (2006). Reduction of Tissue Plasminogen Activator-Induced Matrix Metalloproteinase-9 by Simvastatin in Astrocytes. *Stroke* 37, 1910–1912.
- Wang, T., Fu, F., Han, B., Zhu, M., Yu, X., and Zhang, L. (2009). Aspirin Attenuates Cerebral Ischemic Injury in Diabetic Rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117, 181–185.
- Wardlaw, J., Murray, V., Berge, E., del Zoppo, G., Sandercock, P., Lindley, R., and Cohen, G. (2012). Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet* 379, 2364–2372.
- Weitz-Schmidt, G., Welzenbach, K., Brinkmann, V., Kamata, T., Kallen, J., Bruns, C., Cottens, S., Takada, Y., and Hommel, U. (2001). Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat. Med* 7, 687–692.
- Weng, Y., and Kriz, J. (2007). Differential neuroprotective effects of a minocycline-based drug cocktail in transient and permanent focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 204, 433–442.
- Whitehead, S.N., Bayona, N.A., Cheng, G., Allen, G.V., Hachinski, V.C., and Cechetto, D.F. (2007). Effects of Triflusal and Aspirin in a Rat Model of Cerebral Ischemia. *Stroke* 38, 381–387.
- Wong, W., Lin, V., Boudreau, D., and Devine, E. (2013). Statins in the prevention of dementia and Alzheimer's disease: A meta-analysis of observational studies and an assessment of confounding. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 22, 345–358.
- Xing, C., Arai, K., Lo, E.H., and Hommel, M. (2012). Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int. J. Stroke* 7, 378–385.
- Xiong, Y., Mahmood, A., and Chopp, M. (2010). Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 11, 298.
- Xu, L., Fagan, S., Waller, J., Edwards, D., Borlongan, C., Zheng, J., Hill, W., Feuerstein, G., and Hess, D. (2004). Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *BMC Neurol* 4, 7.
- Yabuuchi, F., Takahashi, M., Aritake, K., Fujimoto, M., Ito, H., Tsuzaki, M., Akai, T., Yamaguchi, M., Hayashi, S., and Nishino, Y. (1999). Post-stroke treatment with imidapril reduces learning deficits with less formation of brain oedema in a stroke-prone substrain of spontaneously hypertensive rats. *Fundam Clin Pharmacol* 13, 475–483.
- Yamada, M., Huang, Z., Dalkara, T., Endres, M., Laufs, U., Waeber, C., Huang, P., Liao, J., and Moskowitz, M. (2000). Endothelial nitric oxide synthase-dependent cerebral blood flow augmentation by L-arginine after chronic statin treatment. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 709–717.

- Yang, Y., and Rosenberg, G.A. (2011). Blood-Brain Barrier Breakdown in Acute and Chronic Cerebrovascular Disease. *Stroke* 42, 3323–3328.
- Yeh, P., Lin, H., Bai, C., Hsieh, F., Ke, D., and Li, Y. (2010). Effect of In-Hospital Initiation of Lipid-Lowering Therapy on Six-Month Outcomes in Patients With Acute Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *Am J Cardiol* 105, 1490–1494.
- Yekhlief, F., Decup, D., Niclot, P., Servan, J., Descombes, S., Richecoeur, J., and Ollivier, A. (2010). Évaluation médico-économique de l'unité neurovasculaire du centre hospitalier de Pontoise. *Rev Neurol Paris* 166, 901-908.
- Yenari, M., Kauppinen, T., and Swanson, R. (2010). Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurother* 7, 378–391.
- Yenari, M.A., Xu, L., Tang, X.N., Qiao, Y., and Giffard, R.G. (2006). Microglia Potentiate Damage to Blood-Brain Barrier Constituents: Improvement by Minocycline In Vivo and In Vitro. *Stroke* 37, 1087–1093.
- Yrjänheikki, J., Keinänen, R., Pellikka, M., Hökfelt, T., and Koistinaho, J. (1998). Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15769–15774.
- Yrjänheikki, J., Tikka, T., Keinänen, R., Goldsteins, G., Chan, P., and Koistinaho, J. (1999). A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13496–13500.
- Yrjänheikki, J., Koistinaho, J., Kettunen, M., Kauppinen, R., Appel, K., Hüll, M., and Fiebich, B. (2005). Long-term protective effect of atorvastatin in permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1052, 174–179.
- Zacharek, A., Chen, J., Cui, X., Yang, Y., and Chopp, M. (2009). Simvastatin Increases Notch Signaling Activity and Promotes Arteriogenesis After Stroke. *Stroke* 40, 254–260.
- Zechariah, A., ElAli, A., and Hermann, D.M. (2010). Combination of Tissue-Plasminogen Activator With Erythropoietin Induces Blood-Brain Barrier Permeability, Extracellular Matrix Disaggregation, and DNA Fragmentation After Focal Cerebral Ischemia in Mice. *Stroke* 41, 1008–1012.
- Zhang, L., Zhang, Z., Ding, G., Jiang, Q., Liu, X., Meng, H., Hozeska, A., Zhang, C., Li, L., Morris, D., et al. (2005). Multitargeted Effects of Statin-Enhanced Thrombolytic Therapy for Stroke With Recombinant Human Tissue-Type Plasminogen Activator in the Rat. *Circulation* 112, 3486–3494.
- Zhang, L., Zhang, Z.G., Liu, X.S., Hozeska-Solgot, A., and Chopp, M. (2007). The PI3K/Akt Pathway Mediates the Neuroprotective Effect of Atorvastatin in Extending Thrombolytic Therapy After Embolic Stroke in the Rat. *Arter. Thromb Vasc Biol* 27, 2470–2475.
- Zhang, L., Chopp, M., Jia, L., Cui, Y., Lu, M., and Zhang, Z.G. (2009). Atorvastatin extends the therapeutic window for tPA to 6 h after the onset of embolic stroke in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 1816–1824.

- Zhang, L., Chopp, M., Zhang, R., Wang, L., Zhang, J., Wang, Y., Toh, Y., Santra, M., Lu, M., and Zhang, Z. (2010). Erythropoietin Amplifies Stroke-Induced Oligodendrogenesis in the Rat. *PLoS ONE* 5, e11016.
- Zhang, L., Zhang, Z.G., and Chopp, M. (2012). The neurovascular unit and combination treatment strategies for stroke. *Trends Pharmacol Sci* 33, 415–422.
- Zhang, X., Deguchi, S., Deguchi, K., Ohta, Y., Yamashita, T., Shang, J., Tian, F., Liu, N., Liu, W., Ikeda, Y., et al. (2011). Amlodipine and atorvastatin exert protective and additive effects via antiapoptotic and antiautophagic mechanisms after transient middle cerebral artery occlusion in Zucker metabolic syndrome rats. *J Neurosci Res* 89, 1228–1234.
- Zhao, L.-R., Singhal, S., Duan, W.-M., Mehta, J., and Kessler, J.A. (2007a). Brain Repair by Hematopoietic Growth Factors in a Rat Model of Stroke. *Stroke* 38, 2584–2591.
- Zhao, L.-R., Berra, H.H., Duan, W.-M., Singhal, S., Mehta, J., Apkarian, A.V., and Kessler, J.A. (2007b). Beneficial Effects of Hematopoietic Growth Factor Therapy in Chronic Ischemic Stroke in Rats. *Stroke* 38, 2804–2811.
- Zheng, Z., Schwab, S., Grau, A., and Berger, C. (2007). Neuroprotection by early and delayed treatment of acute stroke with high dose Aspirin. *Brain Res* 1186, 275–280.
- Zhou, Y., Ye, X., Yu, F., Zhang, X., Qin, Y., Lu, J., and He, J. (2013). Lipid management in the prevention of stroke: a meta-analysis of fibrates for stroke prevention. *BMC Neurol* 13, 1.
- Zhu, H.F., Newcommon, N.N., Cooper, M.E., Green, T.L., Seal, B., Klein, G., Weir, N.U., Coutts, S.B., Watson, T., Barber, P.A., et al. (2009). Impact of a stroke unit on length of hospital stay and in-hospital case fatality. *Stroke* 40, 18–23.
- Del Zoppo, G.J. (2009a). Relationship of Neurovascular Elements to Neuron Injury during Ischemia. *Cerebrovasc Dis* 27, 65–76.
- Del Zoppo, G.J. (2009b). Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 158, 972–982.
- Del Zoppo, G.J. (2010). The neurovascular unit in the setting of stroke. *J Int Med* 267, 156–171.

ANNEXE

**PPARs: a potential target for a disease-modifying strategy
in stroke**

Thavarak Ouk, Camille Potey, Sophie Gautier, Michèle Bastide, Dominique
Deplanque, Bart Staels, Patrick Duriez, Didier Leys, Régis Bordet

Current Drug Targets 2013 ; 14 : 752 - 767

RESUME

L'accident vasculaire cérébral ischémique reste un problème majeur de santé publique, contre lequel l'arsenal thérapeutique reste très limité. L'atorvastatine (AT), utilisée en prévention cardiovasculaire, possède des effets pléiotropes lui conférant un pouvoir protecteur dans l'AVC. Les objectifs de cette thèse étaient d'évaluer et de caractériser les effets neuro- et vasculoprotecteurs de l'AT dans l'ischémie cérébrale, et la part jouée par le récepteur nucléaire PPAR α . Des souris C57BL/6J sauvages et KO-PPAR α ont été soumises à ischémie-reperfusion (I/R) cérébrale. Elles étaient traitées par AT préventivement pendant 14 jours ou après I/R pendant 24 ou 72 heures. L'effet neuroprotecteur est évalué histologiquement et par des tests fonctionnels moteurs. L'effet vasculoprotecteur est évalué sur l'artère cérébrale moyenne par étude de la fonction endothéliale et sur les microvaisseaux cérébraux par étude de leur structure et des interactions leucocytes-endothélium. Le traitement préventif et aigu par AT induit une diminution du volume lésionnel, et une amélioration de la récupération fonctionnelle chez les animaux traités à la phase aiguë. Le traitement aigu permet de préserver la fonction endothéliale et l'intégrité des microvaisseaux cérébraux, et de limiter les interactions leucocytes-endothélium. PPAR α est nécessaire aux effets neuro- et vasculoprotecteurs de l'AT dans l'ischémie cérébrale. Ce travail met en évidence l'intérêt de l'atorvastatine en tant qu'agent neuroprotecteur pléiotrope dans l'ischémie cérébrale.

ABSTRACT

Ischemic stroke still is a heavy public health burden, as effective therapeutic means remain scarce. Atorvastatin (AT), widely used as a preventive treatment in the cardiovascular field, possesses pleiotropic effects that give it protective properties in stroke. The goals of this work were to assess and characterize the neuro- and vasculoprotective effects of AT in cerebral ischemia, and the part played by PPAR α . Wild-type and PPAR α -KO C57BL/6J mice were submitted to cerebral ischemia-reperfusion (I/R). They were treated with AT before I/R for 14 days or acutely after I/R for 24 or 72 hours. Neuroprotection is assessed histologically and by a motor functional evaluation. Vasculoprotection is assessed on the middle cerebral artery by evaluating the endothelial function and on cerebral microvessels by evaluating their structure and the interactions between leukocytes and the vascular wall. Preventive and acute treatments with AT induce a reduction in lesion volumes, functional recovery was improved in acutely treated animals. The acute treatment with AT preserves the endothelial function and the microvascular integrity, and reduces the interactions between leukocytes and the endothelium. PPAR α is necessary for AT neuro- and vasculoprotective effects to take place. This work highlights the interest of atorvastatin as a pleiotropic neuroprotective agent in ischemic stroke.