

UNIVERSITE d'ARTOIS
U.F.R de sciences

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ
EN SCIENCES DE LA VIE

Présentée par
Caroline Mysiorek

**La Barrière Hémato Encéphalique et l'ischémie
cérébrale : étude *in vitro* de la dysfonction et
de la protection microvasculaire.**

Composition du jury :

Rapporteurs :

Pr. François LASBENNES
Pr. Luc LEYBAERT

Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
Ghent University, Ghent, Belgium.

Examineurs :

Dr Dominique DEPLANQUE
Dr. Catherine HEURTEAUX

Université de Lille 2, Lille, France.
Université de Sophia Antipolis, Nice, France.

Directeur de thèse:

Pr Laurence FENART-TILLOY

Université d'Artois, Lens, France.

Tuteur de thèse:

Dr Vincent BEREZOWSKI

Université d'Artois, Lens, France.

Je dédie ce travail à Nicolas...

...à mes parents et à mon frère

UNIVERSITE D'ARTOIS
U.F.R des sciences

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ
EN SCIENCES DE LA VIE

Présentée par
Caroline Mysiorek

**La BHE et l'ischémie cérébrale : étude *in vitro*
de la dysfonction et de la protection
microvasculaire.**

Composition du jury :

Rapporteurs :

Pr. François LASBENNES

Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

Pr. Luc LEYBAERT

Ghent University, Ghent, Belgium.

Examineurs :

Dr Dominique DEPLANQUE

Université de Lille 2, Lille, France.

Dr. Catherine HEURTEAUX

Université de Sophia Antipolis, Nice, France.

Directeur de thèse:

Pr Laurence FENART-TILLOY

Université d'Artois, Lens, France.

Tuteur de thèse:

Dr Vincent BEREZOWSKI

Université d'Artois, Lens, France.

Je tiens sincèrement à remercier,

Mr le professeur Roméo Cecchelli,

En m'accueillant dans votre laboratoire, vous m'avez permis de vivre une expérience très enrichissante. Soyez assuré de ma plus grande reconnaissance.

Mr le Professeur François Lasbennes et Mr le Professeur Luc Leybaert,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Soyez assurés de mon estime et de mon plus grand respect d'avoir accepté cette lourde tâche.

Mme le directeur de recherche Catherine Heurteaux et Mr le Docteur Dominique Deplanque,

Je suis très honorée que vous ayez accepté d'être les examinateurs de ce travail. Votre examen de cette thèse et des travaux qui y sont présentés sera un privilège. Trouvez ici toute ma gratitude et mon plus profond respect.

Je souhaite témoigner de ma profonde reconnaissance envers mes encadrants de thèse,

Mme le Professeur Laurence Fenart-Tilloy et Mr le Docteur Vincent Berezowski.

Laurence, merci pour tes conseils et ton encadrement durant ces quatre années et lors de la rédaction de ce mémoire.

Vincent, tu m'as accompagné dans l'apprentissage du métier de chercheur. Je te remercie pour ta patience et tes nombreux conseils.

J'espère que cette thèse est à la hauteur de la confiance que vous n'avez cessés de m'accorder tout au long de ces 4 années.

Un grand merci à **Lucie, Maxime et Yannick** *alias* la « **Mice Team** »

Merci infiniment d'avoir toujours été au rendez-vous lors de notre « rituel » du jeudi !

Je remercie également tous **les membres du LBHE et de Cellial Technologie**

Ce travail n'aurait pu aboutir sans votre aide, vos conseils et vos encouragements. Ces quelques années à vos côtés furent un réel plaisir. Trouvez ici l'expression de ma gratitude et de ma sincère amitié.

La région Nord Pas-de-Calais

Pour avoir financé ces travaux de recherche

SOMMAIRE

	Pages
Résumé	1
Abstract.....	2
Abbreviations.....	3
Introduction.....	5
 Etude Bibliographique 	
Chapitre I La Barrière Hémato-Encéphalique	9
I Les capillaires cérébraux, support anatomique de la BHE.....	9
I.1 Eléments de physiologie des capillaires cérébraux.....	9
I.2 Structure des capillaires cérébraux.....	11
II Les propriétés restrictives de la BHE.....	13
II.1 Une barrière physique.....	13
II.1.1 Le complexe jonctionnel intercellulaire.....	13
II.1.1.1 Les jonctions adhérentes.....	14
II.1.1.2 Les jonctions serrées	15
II.1.1.2.1 Les protéines transmembranaires.....	15
II.1.1.2.2 Les protéines cytosoliques.....	16
II.1.2 Les vésicules et les canaux trans-endothéliaux	18
II.2 Une barrière métabolique	18
II.2.1 Les enzymes	18
II.2.2 Les pompes d'efflux	19
II.3 Induction des propriétés de barrière physique et métabolique	21
II.3.1 Les péricytes.....	21
II.3.2 Les astrocytes	22
II.3.3 La membrane basale.....	23
III Une barrière sélective.....	24
III.1 Le transport des nutriments.....	24
III.2 Transport des macromolécules et des particules	29
IV L'unité neuroglieuse	32
IV.1 Le couplage métabolique neurovasculaire.....	32
IV.2 Les microvaisseaux et les propriétés de la BHE	36
Chapitre II L'ischémie cérébrale et la neuroprotection	38
I Les AVC chez l'homme.....	38
I.1 Définition, épidémiologie, les facteurs de risques	38
I.2 Les conséquences cérébro-vasculaires de l'ischémie cérébrale	39
I.2.1 Les conséquences vasculaires : l'œdème cérébral et l'hémorragie cérébrale ..	39
.....	39
I.2.2 Les conséquences au sein du tissu nerveux : construction et évolution de	41
l'infarct	41

	Pages
I.3 La cascade des mécanismes cellulaires lésionnels	43
I.3.1 Les mécanismes conduisant à la mort neuronale.....	43
I.3.1.1 Les premiers effets de l'épuisement en énergie et l'excitotoxicité.....	43
I.3.1.2 Le stress oxydant	44
I.3.1.3 L'apoptose:	47
I.3.2 Les mécanismes menant à l'augmentation de la perméabilité vasculaire....	49
I.3.2.1 Les effets précoces sur la paroi vasculaire : la dysfonction de la BHE.....	49
I.3.2.2 La dégradation de la membrane basale.....	51
I.3.2.3 L'inflammation et la rupture de la BHE.....	52
I.3.2.4 L'angiogénèse.....	54
I.4 Les modèles d'étude de la perméabilité vasculaire lors de l'ischémie cérébrale....	56
I.4.1 Etudes <i>in vivo</i>	56
I.4.2 Etudes <i>in vitro</i>	59
II Les thérapies	61
II.1 Traiter la phase aiguë de l'ischémie	62
II.1.1 La reperfusion par thrombolyse	62
II.1.2 Les composés neuroprotecteurs	63
II.2 Le concept de preconditionnement : induction de la résistance à l'ischémie.	66
II.3 Les molécules à effet pléiotrope.....	69
II.3.1 Les agonistes des récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor)	69
II.3.1.1 Structure des récepteurs PPAR.....	69
II.3.1.2 Localisation et expression tissulaire des récepteurs PPAR.....	71
II.3.1.3 Les agonistes des récepteurs PPAR.....	71
II.3.1.4 Mécanismes d'action des récepteurs PPAR	72
II.3.1.5 Les récepteurs PPARs et l'ischémie cérébrale.....	73
II.3.2 Les Statines	75
Conclusion de l'étude bibliographique.....	78

Travaux Personnels

I. Etude de l'effet d'un agoniste du récepteur nucléaire PPAR-α sur la perméabilité de la BHE lors de l'ischémie cérébrale	79
II. Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la protection pharmacologique de la BHE contre l'ischémie cérébrale : première analyse du transcriptome endothélial.	97
III. Etude des effets de la réoxygénation sur la BHE ischémisée.....	109
III.1 Introduction	110
III.2 Matériels et Méthodes.....	112
III.3 Résultats et discussion.....	122

	Pages
III.3.1 La BHE présente un profil de perméabilité multiphasique lors de l'OGD-réoxygénation.	122
III.3.2 Le profil d'augmentation de la perméabilité de la BHE lors de la réoxygénation dépend des cellules gliales.	124
III.3.3 L'augmentation multiphasique de la perméabilité endothéliale implique une modulation de la fonction des jonctions serrées.	129
III.3.4 Etude de l'ultrastructure des jonctions serrées lors de l'OGD/réoxygénation ...	133
III.3.5 Mesure du coefficient apparent de diffusion de l'eau : Translation vers un modèle expérimental préclinique.	138
III.3 Conclusion.....	142

Conclusion Générale

Discussion générale	143
I. La BHE : une cible pharmacologique pertinente pour traiter l'ischémie cérébrale	144
II. Etude des effets de la reperfusion sur le modèle in vitro de BHE	146
Perspectives de recherche	150

Bibliographie

Références Bibliographiques	153
--	------------

	Pages
Figure 1 : Equation de Starling décrivant la perméabilité capillaire dans les conditions physiologiques.....	10
Figure 2 : Structure des capillaires cérébraux, modifié de (Delorme et al. 1968).....	12
Figure 3 : Modèle des interactions entre les principales protéines des jonctions serrées, modifié de (Abbott et al. 2009).....	14
Figure 4 : Les différentes voies de transport au travers de l'endothélium de la BHE.....	24
Figure 5 : Structure générale des aquaporines, modifié de (Badaut et al. 2002).....	25
Figure 6 : Transport ionique au travers de la BHE modifié de (Zlokovic 2008).....	26
Figure 7 : Localisation des transporteurs impliqués dans l'influx et l'efflux ainsi que dans le transport des peptides et des protéines au niveau de la BHE, modifié de (Ohtsuki and Terasaki 2007).....	27
Figure 8 : Modèle d'assemblage et dissociation de vésicules recouvertes de clathrine au niveau de la membrane cellulaire lors d'une endocytose dépendante d'un récepteur.....	30
Figure 9 : Les cavéoles.....	31
Figure 10 : Les interactions cellulaires au sein de l'unité neurovasculaire de (Iadecola 2004).....	33
Figure 11 : Les agents vasoactifs libérés par les neurones et les astrocytes lors de l'activité synaptique de (Iadecola 2004).....	34
Figure 12 : Mouvement des ions K ⁺ au sein de l'unité neuroglivovasculaire modifié de (Bastide et al. 2007).....	35
Figure 13 : Profil général hypothétique de la cinétique de perméabilité de la BHE en fonction de la modulation du flux sanguin lors de l'ischémie reperfusion selon (Sandoval and Witt 2008).....	40
Figure 14 : Gradation des événements cellulaires dans le temps (Dirnagl et al. 1999).....	42
Figure 15 : Diagramme simplifié de la cascade ischémique d'après (Dirnagl et al. 1999).....	43
Figure 16 : Cascade physiopathologique menant à la mort neuronale d'après (Crack and Taylor 2005).....	44
Figure 17 : Initiation et propagation de la peroxydation des lipides membranaires (modifié de (19575472)).....	46
Figure 18 : La voie d'activation intrinsèque de l'apoptose. (D'après Broughton 2009).....	48
Figure 19 : La voie d'activation extrinsèque de l'apoptose (d'après Broughton 2009).....	49
Figure 20 : La cascade inflammatoire au sein des cellules endothéliales lors de l'ischémie cérébrale (Huang et al. 2006).....	53
Figure 21 : Récapitulatif des molécules neuroprotectrices en essai clinique développées pour la phase aiguë de l'ischémie cérébrale d'après (Ginsberg 2008).....	65
Figure 22 : Structure des récepteurs PPAR selon (Diradourian et al. 2005).....	70
Figure 23 : Mécanismes de régulation de la transcription par les récepteurs PPAR d'après (Touyz and Schiffrin 2006).....	73
Figure 24 : Représentation schématique d'un protocole d'analyse par puce à ADN.....	100
Figure 25 : Analyse par RT-qPCR de l'expression dans les cellules endothéliales de gènes ciblés pour la validation des résultats de la puce à ADN.....	104
Figure 26 : Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes TNF- α , IL1- β , IL1R1, IL-6, ET-1, dans les cellules endothéliales de BHE en condition d'OGD avec ou sans traitement à l'acide fénofibrique.....	105
Figure 27 : Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes cxcl1, cxcl2, E-selectine dans les cellules endothéliales de BHE en condition d'OGD avec ou sans traitement à l'acide fénofibrique.....	106
Figure 28 : Analyse par PCR quantitative de l'expression des gènes codant pour ICAM-1 et VCAM-1 pour la validation des résultats de la puce à ADN.....	107

	Pages
Figure 29 : Modèle de BHE <i>in vitro</i>	113
Figure 30 : Synopsis de l'expérimentation d'OGD/reperfusion sur le modèle <i>in vitro</i> de BHE murine.....	114
Figure 31 : Méthode d'étude de la perméabilité de l'endothélium au LY.	115
Figure 32 :Modèle d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne par la carotide interne..	119
Figure 33 : Principe d'analyse de la cartographie ADC corrélé avec des clichés anatomiques T2. Les images obtenues chez le rat suite à l'ischémie reperfusion pour un suivi de 24h à 2 mois.	121
Figure 34 : Evolution de la perméabilité des cellules endothéliales au LY lors de l'OGD-réoxygénation.....	123
Figure 35 : Evolution de la perméabilité des cellules endothéliales lors de la réoxygénation en absence de cellules gliales (A) ou en présence de cellules gliales non ischémiées (B).....	125
Figure 36 : Etude de viabilité des cellules gliales par marquage des noyaux au hoeuscht/IP. Bar=25µm.....	126
Figure 37 : Etude de l'augmentation de la perméabilité endothéliales par le milieu conditionné et le lysat de cellules gliales ischémiées (lysate I) ou non ischémiées (lysate N).	127
Figure 38 : Graphique de corrélation de la perméabilité endothéliales et le dosage du glutamate.	128
Figure 39 : Localisation d'une protéine de jonctions serrées, la claudine-5 au sein d'une monocouche de cellules endothéliales..	131
Figure 40 : Etude ultrastructurale du passage de la WGA-HRP au travers des jonctions serrées des cellules endothéliales de BHE..	136
Figure 41 : Courbe de mesure du coefficient d'ADC lors des 60 minutes d'occlusion chez la souris.	139
Figure 42 : Courbe de variation du coefficient apparent de diffusion de l'eau mesuré chez la souris suite à 60 minutes d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne dans les régions corticale et sous corticale.	140

TABLEAUX	Pages
Tableau 1 : Tableau récapitulatif des substrats de certains ABC transporteurs présents au niveau de la BHE d'après Dauchy, S. 2008.	20
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des associations cellulaire ainsi que des différences de structure entre les segments des microvaisseaux cérébraux modifié de (Ge et al. 2005).	37
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des résultats des études <i>in vivo</i> de la perméabilité de la BHE lors de l'ischémie reperfusion.	58
Tableau 4 : Liste des inducteurs de tolérance à l'ischémie selon (Kirino 2002).	67
Tableau 5 : Listes des mécanismes potentiels impliqués dans la tolérance à l'ischémie d'après (Kirino 2002).	68
Tableau 6 : Liste des ligands endogènes et exogènes des récepteurs PPAR.	72
Tableau 7 : Résultats issus de la puce à ADN des gènes dont l'expression est modulée suite au traitement des cellules endothéliales à l'acide fénofibrique dans les conditions témoins..	103

DOCUMENTS

Pages

Article: "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α activation protects brain capillary endothelial cells from Oxygen-Glucose deprivation-induced hyperpermeability in the blood brain barrier." 82

Résumé

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une interface localisée au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Elle présente des caractéristiques physiques et métaboliques spécifiques restreignant les échanges entre le sang et le cerveau dans le but de maintenir l'homéostasie du système nerveux central. Dans des conditions pathologiques comme l'ischémie cérébrale, la perte de son intégrité provoque l'apparition d'un œdème vasogénique qui aggrave considérablement le pronostic vital des patients. Malheureusement, les mécanismes impliqués dans l'hyperperméabilité vasculaire demeurent inconnus, ce qui limite l'utilisation de la seule thérapie disponible à 5% des patients. Depuis qu'aucun agent pharmacologique n'a réussi à être neuroprotecteur, notre compréhension des rapports entre le sang et le cerveau est remise en cause. La complexité des interactions entre la BHE et les cellules nerveuses a mené au concept d'une unité fonctionnelle dite neurovasculaire. Ainsi de nouvelles stratégies de protection émergent à partir d'observations au niveau vasculaire.

Ainsi la première partie de nos travaux a consisté à étudier l'effet vasculoprotecteur potentiel du fénofibrate, un hypolipémiant agoniste du récepteur nucléaire PPAR- α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha), dont le bénéfice est observé en clinique depuis quelques années et plus récemment dans une étude expérimentale menée chez la souris. Les mécanismes de cette protection aujourd'hui inconnus, pourraient impliquer la BHE réputée très peu perméable à ce fibrate. Un renforcement de la BHE limiterait la formation de l'œdème cérébral. Pour cela nous avons adapté un modèle *in vitro* syngénique murin de BHE aux études de perméabilité en condition d'OGD (oxygen and glucose deprivation) mimant les conséquences immédiates de l'occlusion, toute première étape de l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique. Le modèle consiste en une co-culture de cellules endothéliales primaires de capillaires cérébraux et de cellules gliales primaires. Nos travaux démontrent qu'un traitement préventif au fénofibrate protège l'endothélium en limitant l'hyperperméabilité induite par l'OGD. Cette action protectrice cible exclusivement l'endothélium et dépend de l'activation de PPAR- α démontré par l'absence d'effet protecteur sur les cellules endothéliales dont le gène codant pour PPAR- α a été invalidé.

La seconde partie de l'étude s'est intéressée aux dommages vasculaires de la reperfusion, étape plus tardive de l'ischémie cérébrale connue pour aggraver l'œdème vasogénique et mener à des hémorragies fatales. A l'aide de notre modèle *in vitro*, nous avons étudié l'effet de la réoxygénation sur la perméabilité vasculaire dans le but de se rapprocher des conditions ischémiques *in vivo*. Après une incubation en condition d'OGD, la co-culture est replacée dans un milieu réoxygéné pendant une période allant de 2h à 24h. La mesure de la perméabilité vasculaire a démontré un profil multiphasique de l'ouverture de la BHE dépendant de la présence des cellules gliales. L'analyse en microscopie électronique des cellules endothéliales a suggéré une modulation fine de la fonctionnalité des jonctions serrées endothéliales. De plus, l'étude en IRM de diffusion chez la souris *in vivo* a révélé des mouvements d'eau qui suggèrent une perturbation de l'homéostasie hydrique du parenchyme cérébral au voisinage de l'occlusion dans les étapes précoces mais aussi dans les étapes tardives.

En conclusion, l'ensemble des travaux met en avant la possibilité d'une préservation pharmacologique de l'intégrité de la BHE au début de l'ischémie cérébrale. Celle-ci montre l'intérêt des approches *in vitro* utilisant un modèle cellulaire pertinent et caractérisé. La validation de la cible cellulaire et moléculaire du fénofibrate à l'aide de notre modèle ouvre une première voie d'exploration des mécanismes impliqués dans ce phénomène de protection microvasculaire précoce. Cependant, la dysfonction retardée de la BHE est également un élément à prendre en compte pour se rapprocher de la physiopathologie de l'ischémie *in vivo* et espérer à terme une amélioration de l'approche thérapeutique de cette pathologie.

Abstract

The Blood brain barrier (BBB) is an interface localised at brain capillary endothelial cells. The BBB possesses both physical and metabolic restrictive properties aiming at the maintenance of the central nervous system homeostasis. But under pathological conditions like ischemic stroke, the loss of BBB integrity induces a cerebral vasogenic edema which considerably worsens the vital prognosis of patients. The mechanisms underlying this vascular hyperpermeability are currently unknown thus limiting the use of the only medical intervention available at only 5% of stroke patients. Since no pharmacological molecule succeeded in being neuroprotective, our understanding of the relationships between blood and brain is questioned. The complex interactions between the BBB and nervous cells have lead to the concept of a functional unit, termed the neurovascular unit. Thus, new strategies are recently emerging from observation of vascular events.

Thus, the first aim of our study was to test the potential vasculoprotective action of fenofibrate, a hypolipemic drug known as an activator of the nuclear receptor PPAR- α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha), as benefit against stroke was observed in clinics since a few years, and recently reported in an experimental study. Yet unknown mechanisms, the protective effect may be exerted on the BBB since reported as impermeable to this compound. An early tightening of the BBB would limit the extent of brain edema. Hence, we have adapted a mouse syngenic BBB *in vitro* cell model to permeability studies under the stress condition found at the early stage of ischemic stroke defined *in vitro* as oxygen and glucose deprivation (OGD). This stress simulates the early consequences of occlusion. This model consists of a co-culture of primary brain capillary endothelial cells together with primary glial cells. We have demonstrated that a preventive treatment with fenofibrate has a protective effect on the BBB by limiting the hyperpermeability induced by the OGD condition. This effect targets endothelial cells exclusively and depends on PPAR- α activation, as revealed by the absence of protective action of fenofibrate on PPAR- α deficient endothelial cells.

The second part of the study has focused on vascular reperfusion injury, a later stage of ischemia known to worsen vasogenic oedema and to lead to fatal haemorrhage. Using our *in vitro* BBB model, we have studied the effect of reoxygenation on vascular permeability in order to closely simulate *in vivo* ischemic condition. Following incubation under OGD condition, the co-cultures were placed into an oxygenated culture medium from 2h to 24h. The BBB permeability demonstrated a multiphasic opening of the BBB which depended on glial cells presence. Electronic microscopy analysis of BBB endothelial cells suggested a fine modulation of tight junction functionality. Moreover, the MRI diffusion analysis in mice has revealed particular water movements suggesting an early disturbance in water homeostasis of brain parenchyma in the vicinity of occlusion.

In conclusion, this work put forward the idea of a pharmacological BBB protection at the early stage of ischemic stroke. This demonstrates the relevance of *in vitro* approaches using a pertinent and well characterised cell model. The validation of cellular and molecular targets of fenofibrate opens a way of first exploration of mechanisms involved in this early microvascular protection phenomenon. But the late BBB dysfunction also needs to be taken into account for a complete fitting with *in vivo* stroke pathophysiology and an improvement of the therapeutic approaches to this pathology.

Abbréviations

ABC	ATP-binding cassette	Kir2.x	Canaux K ⁺ à rectification entrante
ACO	Acyl coenzymeA oxydase	LDB	Ligand binding domain
ADC	Apparent diffusion coefficient	LDL	Low density lipoprotein
ADN	Acide desoxyribonucléique	LY	Lucifer Yellow
AF	Activating function	MAGUK	Membrane associated guanylate kinase
AG	Acides gras	MAO	Mono amine oxidase
AIF	Apoptosis inducing factor	MAO	Monoamine oxydase
AIT	Accident ischémique transitoire	MCAO	Middle cerebral artery occlusion
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionic acid	MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
Ang	Angiopoïétine	MCT-1	Monocarboxylate transporter-1
AP-1	Activated protein-1	MDR	Multidrug resistance
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor-1	MLC	Myosin like chain
AQP	Aquaporine	MLCK	Myosin like chain kinase
ATP	Adénosine triphosphate	MMP	Metalloproteinase
AVC	Accident vasculaire cérébral	MRP	Multidrug resistance-associated protein
Bcl	B-cell leukemia/lymphoma	NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
BCRP	Breast cancer related protein	NF-κB	Nuclear factor-kappaB
BHE	Barrière hémato-encéphalique	NMDA	N-Méthyl-D-aspartate
CGH	Comparason genome hybridation	nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
CINC	Cytokine induced neutrophil chemoattractant	nNOS	Neuronal nitric oxide synthase
COX-2	Cyclooxygénase-2	NO	Nitric oxide
CpT1	Carnitine palmitoyl transferase-1	NOS	Nitric oxide synthase
DBD	DNA binding domain	OAT	Organic anion transporter
DHA	Acide docosahexaénoïque	OATP	Organic anion-transporting polypeptide
DR-1	Direct repeat-1	OCTN2	Novel organic cation transporter 2
DSPA	<i>Desmodus rotundus</i> salivary plasminogen activator	OGD	Oxygen and glucose deprivation
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	PARP	Poly ADP ribose polymérase
EPA	Acide eicosapentanoïque	PBS-CMF	Phosphate buffer saline Ca ²⁺ Mg ²⁺ free
ET-1	Endotheline-1	PCR	Polymerase chain reaction
GLUT-1	Glucose transporter-1	PDGF	Platelet derived growth factor
GSHPx	Glutathion peroxidase	PDK-4	Pyruvate dehydrogenase kinase-4
γ-GT	γ -Glutamyl transpeptidase	PDZ	PSD-95/diclarge/ZO-1 like protein
HDL	High density lipoprotein	Pe	coefficient de perméabilité endothéliale
HETE	Hydroxyeicosatétraénoïque acid	PECAM	Platelet endothelial cellular adhesion molecule
HIF-1	Hypoxia inductible factor-1	P-gp	P-glycoprotéine
HIF-1	Hypoxia inductible factor-1	PKC	Protéine kinase C
HMG-CoA	3-hydroxy 3-méthylglutaryl coenzyme A	PNN	Poly nucléaire neutrophile
HODE	Hydroxyoctadécadiénoïque acid	PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
HOTE	Hydroxyoctadécatriénoïque acid	PPAR	PPAR-knock-out
ICAM	Intercellular adhesion molecule	PPRE	Peroxisome proliferator response element
IL	Interleukine	ROS	Reactive oxygen species
iNOS	Inductible nitric oxide synthase	RT	Reverse transcriptase
IRM	Imagerie par résonance magnétique	rt-PA	recombinant tissu-type plasminogen activator
JAM	Junctional adhesion molecule	RT-qPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction

RXR	Retinoïc-X-receptor	UNGV	Unité Neuro Glio Vasculaire
SNC	Système Nerveux Central	VCAM	Vascular cell adhesion molecule
SOD	Superoxide dismutase	VE-cadherine	Vascular Endothelial-cadherine
STAT-3	Signal transducer and activator of transcription-3	VEGF	Vascular endothelial growth factor
TEER	Trans endothelial electric resistance	WGA-HRP	Wheat germ agglutinin conjugated Horseradish peroxidase
TGF-β	Transforming growth factor- β	ZO	Zonulae occludens
TNF-α	Tumor necrosis factor- α		
TZD	thiazolidinedione		

Introduction

Dans le domaine des neurosciences, les travaux de recherche se focalisent sur les neurones ainsi que leurs interactions avec les cellules gliales qui supportent leur fonction. Aujourd'hui un concept est né de l'interaction d'un ensemble cellulaire constitué de neurones mais également de cellules non neuronales telles les astrocytes, les péricytes, les cellules microgliales ainsi que d'une composante vasculaire représentée par les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux. Cet ensemble cellulaire constitue ce que l'on appelle l'unité neuroglivascular (UNGV). Dans les conditions physiologiques, les communications entre les cellules de l'unité contribuent à l'établissement et au maintien des propriétés de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Localisée au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux, cette barrière possède des propriétés restrictives spécifiques (présence de jonctions serrées intercellulaires, rareté des vésicules de pinocytose...) afin de contrôler l'homéostasie du système nerveux central favorable au bon fonctionnement des neurones et des cellules gliales.

Cependant, l'intégrité de la BHE est compromise dans de nombreuses pathologies cérébrales, ce qui explique qu'elle représente un enjeu dans le développement de traitements pharmacologiques. C'est notamment le cas de l'ischémie cérébrale, une pathologie lors de laquelle la rupture de la BHE conduit à la formation d'un œdème vasogénique délétère et dans les cas les plus graves, d'une hémorragie cérébrale. Cette rupture de la BHE est suspectée d'être la conséquence d'une dysfonction beaucoup plus précoce qui pourrait contribuer au risque de complications observées lors de la thrombolyse, seul traitement existant de la phase aiguë de l'ischémie. Ainsi, seulement 5% des patients peuvent bénéficier de ce traitement, connu pour limiter voir éviter les dommages neurologiques. Des molécules ont de ce fait été développées dans l'espoir d'être utilisées en phase aiguë pour permettre la survie des neurones. Mais à ce jour, aucun composé pharmaceutique n'a réussi à protéger les neurones de la mort. L'échec de la neuroprotection pourrait en partie s'expliquer par la complexité des interactions au sein de l'UNGV qui comprend une dysfonction vasculaire localisée au niveau de la BHE. Ainsi l'étude de la dysfonction vasculaire et l'identification des mécanismes responsables de la perte d'intégrité de la BHE lors de l'ischémie cérébrale sont indispensables pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ainsi mieux comprendre les interactions entre les cellules de l'UNGV permettrait de mieux comprendre les mécanismes induisant la dysfonction de la BHE et l'action des composés pharmaceutiques.

La mise au point au laboratoire d'un modèle *in vitro* primaire syngénique murin de BHE qui consiste en une co-culture de cellules endothéliales issues d'une fraction enrichie en capillaires cérébraux et de cellules gliales a permis de recréer les interactions cellulaires présentes *in vivo* (Coisne et al. 2005).

La première partie de notre travail s'inscrit dans le cadre du développement de traitements préventifs. Notre étude a consisté à mieux comprendre l'action du fénofibrate, un agoniste du récepteur nucléaire PPAR- α ayant démontré des effets bénéfiques en traitement préventif sur les lésions ischémiques *in vivo*. De plus, ce composé ne passe que très faiblement au travers des cellules endothéliales de la BHE (Deplanque et al. 2003). Nous avons alors étudié l'effet du fénofibrate sur la BHE dans les conditions d'OGD (oxygen and glucose deprivation) mimant l'ischémie cérébrale. De plus, l'utilisation du modèle murin permet l'accès aux outils moléculaires comme les puces à ADN utilisées dans cette étude afin d'identifier le mécanisme d'action du fénofibrate.

Après avoir montré des effets bénéfiques sur la BHE dans l'étape précoce consécutive à l'occlusion, nous nous sommes intéressés aux étapes tardives de la reperfusion sur la perméabilité de la BHE pour prendre en compte toute la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. Cette étude a été réalisée en parallèle avec une analyse en microscopie électronique de l'ultrastructure des jonctions serrées ainsi qu'une analyse IRM *in vivo* pour la mesure du coefficient apparent de diffusion de l'eau.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Dr Vincent BEREZOWSKI et du Pr. Laurence TILLOY-FENART au sein du laboratoire de physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique dirigé par le Pr Roméo CECHELLI (EA 2465 Université d'Artois, Faculté des Sciences Jean Perrin, rue J. Souvraz SP 18, 62307 LENS cedex). Il a été financé par la région Nord Pas-de-Calais.

Le premier chapitre de ce manuscrit est un chapitre bibliographique dans lequel nous exposerons les caractéristiques et les fonctions de la BHE. Nous ferons un rappel de l'état actuel des connaissances sur l'ischémie cérébrale et les stratégies de neuroprotection, pour en arriver à l'exposé de nos travaux puis se terminer sur une discussion générale incluant les conclusions et perspectives en vue de la continuité de ce thème de recherche.

Les travaux de thèse ont fait l'objet de la publication suivante:

Peroxisome proliferator activated receptor alpha activation protects the brain capillary endothelial cells from oxygen and glucose deprivation induced hyperpermeability in the BBB.

Mysiorek C, Culot M, Dehouck L, Derudas B, Staels B, Bordet R, Cecchelli R, Fenart L, Berezowski V,

Current neurovascular research, 2009, 6(3), 181-193.

D'autres recherches réalisées au laboratoire ou en collaboration ont fait l'objet des publications suivantes:

Cerebrovascular protection as a possible mechanism for the protective effects of NXY-059 in preclinical models: an *in vitro* study

Culot M, Mysiorek C, Renftell M, Dehouck M-P, Miller F, Roussel BD, Hommet Y, Vivien D, Lundquist S, Cecchelli R

Brain research, 2009, 19, 1294:144-152.

A polarized localisation of amino acid/carnitin transporter B (0,+) (ATP(0+)) in the blood brain barrier.

Czeredys M, Mysiorek C, Kulikova N, Samluk L, Berezowski V, Cecchelli R, Nalecz KA.

Biochemistry Biophysic research Community, 2008, 376(2); 267-70.

Les communications orales suivantes ont été présentées :

Implication du PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated receptor alpha) dans la neuroprotection: Utilisation d'un modèle *in vitro* de Barrière Hémato-Encéphalique.

Caroline Mysiorek, Maxime Culot, Lucie Dehouck, Régis Bordet, Bart Staels, Roméo Cecchelli, Laurence Fenart-Tilloy & Vincent Berezowski.

- *Réunion annuelle de la Société de circulation et métabolisme du cerveau, Paris V, 26 Janvier 2007.*

- *Réunion annuelle du club de la barrière hémato-encéphalique, Lyon, 14 Mars 2007*

Un modèle knock-out de barrière hémato-encéphalique *in vitro* démontre l'implication du Peroxisome proliferator-activated receptor alpha dans l'action endothéliale du fénofibrate contre l'ischémie cérébrale.

Caroline Mysiorek, Maxime Culot, Lucie Dehouck, Régis Bordet, Bart Staels, Roméo Cecchelli, Laurence Fenart-Tilloy & Vincent Berezowski.

- *8^{ème} journée André Verbert, colloque annuel des doctorants, lille, 18 septembre 2008.*
Prix de la meilleure communication.

PPAR- α activation protects the BBB from OGD-induced hyperpermeability: use of a pathophysiological *in vitro* model.

Caroline Mysiorek, Maxime Culot, Lucie Dehouck, Régis Bordet, Bart Staels, Roméo Cecchelli, Laurence Fenart-Tilloy & Vincent Berezowski.

- *Neurex/SEISC meeting, blood brain interfaces, Strasbourg, April 24th-25th 2009.*

Les communications affichées suivantes ont été présentées:

Involvement of PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha) in vascular neuroprotection: impact on a murine blood-brain barrier *in vitro* model.

Caroline Mysiorek, Maxime Culot, Lucie Dehouck, Régis Bordet, Bart Staels, Roméo Cecchelli, Laurence Fenart-Tilloy & Vincent Berezowski.

- *10^{ème} Journée LARC Neurosciences, LILLE, 10 Novembre 2006.*

- *7th cerebral vascular biology international conference, Ottawa, June 24-28 2007.*

Chapitre I La Barrière Hémato-Encéphalique

Le concept de barrière hémato-encéphalique (BHE) a aujourd'hui plus d'un siècle puisque la première expérience démontrant son existence est apparue en 1885 avec les travaux de Paul Ehrlich. Ce physiologiste avait injecté un colorant vital dans la circulation de souris, lequel avait diffusé dans l'ensemble des organes excepté le cerveau (Erlich 1885). Cette observation avait été interprétée comme résultant d'une faible affinité du colorant pour le tissu cérébral. Mais quelques années plus tard, en 1913, son étudiant Edwin Goldmann a démontré que ce n'était pas le cas puisque l'injection de colorant dans le liquide céphalo-rachidien avait non seulement teinté l'ensemble du cerveau mais en plus n'avait pas diffusé vers le système périphérique (Goldmann 1913). Ce résultat démontrait alors l'existence d'une barrière entre le sang et le cerveau limitant la diffusion entre ces deux compartiments. Le terme de BHE n'apparaît qu'un peu plus tard dans la littérature française (Stern LS 1922) et sa localisation au niveau des capillaires a été établie lorsque les jonctions serrées ont été observées entre les cellules endothéliales de ces capillaires (Reese and Karnovsky 1967).

Cette barrière est maintenant connue comme une interface dynamique dont le rôle de filtre sélectif vise à maintenir le microenvironnement cérébral pour assurer le bon fonctionnement des neurones et des cellules gliales. Son phénotype endothélial particulier se développe sous l'influence des astrocytes issus du tissu glial. Et bien qu'aujourd'hui l'endothélium des capillaires demeure le site principal de la BHE, ses interactions avec les éléments périvasculaires s'étendent jusqu'aux neurones et affichent une complexité croissante qui a récemment mené au concept que l'ensemble de ces cellules vasculaires et nerveuses forment une unité fonctionnelle appelée unité neuroglivasculaire (UNGV).

I Les capillaires cérébraux, support anatomique de la BHE

I.1 Eléments de physiologie des capillaires cérébraux

Le cerveau étant dépourvu de réserves énergétiques le système circulatoire cérébral apporte de manière constante l'énergie nécessaire à sa fonction (Simpson et al. 2007) *via* les capillaires dont la surface d'échange représente 12 à 20 m² (Begley and Brightman 2003; Girouard and Iadecola 2006). Cependant les neurones sont sensibles à leur microenvironnement dont la composition doit être contrôlée. Le maintien de l'homéostasie cérébrale est traditionnellement attribué à une restriction des échanges entre le sang et le cerveau au niveau des capillaires cérébraux support

de la BHE. Mais bien que l'existence de cette barrière ne soit plus remise en question aujourd'hui, on se questionne encore à propos de son étendue dans l'arbre vasculaire cérébral. C'est pourquoi dans la littérature, la BHE est souvent décrite au niveau des microvaisseaux. Cependant, localiser la BHE signifie connaître les différentes composantes de l'arbre vasculaire. La segmentation du système vasculaire n'apparaît pas uniquement au niveau des gros vaisseaux, elle est également présente au niveau des microvaisseaux. Le terme microvaisseau regroupe en réalité trois segments vasculaires morphologiquement et fonctionnellement différents, les artérioles (de 10µm à 100µm de diamètre), les capillaires (de 4µm à 10µm de diamètre) ainsi que les veinules (de 10µm à 100µm de diamètre). Chaque segment possède ses propres caractéristiques physiologiques et fonctionnelles (Simionescu and Simionescu 1991). Le capillaire cérébral présente des propriétés particulières qui le différencie des autres segments de l'arbre microvasculaire. En effet, le capillaire est le site préférentiel des échanges sang/cerveau. Il possède des propriétés spécifiques qui lui confèrent le rôle de filtre sélectif vis-à-vis des molécules apportées par le flux sanguin. La régulation des mouvements d'eau de part et d'autre de la membrane capillaire est régie par la loi de Starling (figure 1a) pour les capillaires périphériques ; en raison de ces propriétés filtrantes, la loi de Starling modifiée décrit les échanges au niveau des capillaires cérébraux (figure 1b).

$$\begin{array}{l}
 \text{Force} \quad \text{Force} \\
 \text{hydrostatique} \quad \text{oncotique} \\
 \text{a) Loi de starling} \quad Q = K_f (\overbrace{\Delta P}^{\text{Force hydrostatique}} - \overbrace{\sigma_p \cdot \Delta \Pi}^{\text{Force oncotique}}) \\
 \text{Force} \\
 \text{osmotique} \\
 \text{b) Loi de starling modifiée} \quad Q = K_f (\Delta P - \sigma_p \cdot \Delta \Pi - \overbrace{\sigma_\alpha \cdot \Delta \pi}^{\text{Force osmotique}})
 \end{array}$$

Figure 1 : Equation de Starling décrivant la perméabilité capillaire dans les conditions physiologiques.

L'équation de Starling classique régit les échanges sang-organe dans les capillaires périphériques (a). La loi de Starling modifiée régit les échanges sang-cerveau dans les capillaires cérébraux (b). Q : débit net de filtration au travers du capillaire; K_f : coefficient de filtration; ΔP : gradient de pression hydrostatique; σ_p : coefficient de réflexion oncotique; σ_α : coefficient de réflexion osmotique; $\Delta \Pi$: gradient de pression oncotique (pression osmotique des protéines); $\Delta \pi$: gradient de pression osmotique des petites molécules.

Classiquement exprimée par l'équation suivante $Q = K_f (\Delta P - \sigma_p \cdot \Delta \Pi)$, avec Q , le débit de filtration au travers du capillaire, et K_f le coefficient de filtration de la paroi capillaire (fonction de la perméabilité capillaire à l'eau et de la surface d'échange), cette loi tient compte des gradients de pression hydrostatique (ΔP) et de pression oncotique ($\Delta \Pi$) entre le capillaire et le tissu, avec σ_p le coefficient de réflexion des protéines plasmatiques sur la paroi capillaire. Cette équation

appliquée aux capillaires cérébraux, intègre l'effet du gradient de pression osmotique ($\Delta\pi$) des petits solutés du plasma, autres que les protéines (avec σ_α le coefficient de réflexion de ces solutés sur la paroi capillaire, ce qui fait $\sigma_\alpha \Delta\pi$) puisque les capillaires cérébraux sont beaucoup moins perméables à ces petits solutés que les capillaires périphériques. L'équation s'écrit alors sous une forme modifiée, $Q = K_f (\Delta P - \sigma_p \Delta\Pi - \sigma_\alpha \Delta\pi)$. Dans les conditions physiologiques, lorsque la BHE est intacte les coefficients de réflexion sont proches de 1, car les propriétés restrictives de la BHE rendent les capillaires cérébraux pratiquement imperméables à la fois aux protéines et aux autres solutés plasmatiques. Le gradient de pression hydrostatique ΔP modéré par le coefficient de filtration K_f , est une force qui favorise la sortie d'eau du capillaire, tandis que le gradient osmotique total (des protéines $\Delta\Pi$ et des autres solutés $\Delta\pi$) représente une force qui s'y oppose. Ainsi quand la BHE est intacte, le débit net d'eau est faible, proche de 0. Cet effet est dû essentiellement au gradient osmotique exercé par les ions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) en solution, puisque leur pouvoir osmotique (285 mOsm kg^{-1}) est largement supérieur à celui des protéines circulantes (1 mOsm.kg^{-1}) (Payen et al. 2003) (Kahle et al. 2009).

En revanche quand la BHE est lésée, le passage des ions et des protéines à travers les capillaires diminue l'influence de la pression osmotique des petits solutés et des protéines (pression oncotique). Les mouvements liquidiens deviennent alors fonction de la pression hydrostatique et du degré de perméabilité membranaire induit par l'atteinte de la BHE. Ceci se réalise, par exemple, progressivement au décours d'une ischémie cérébrale où une perte énergétique rapide provoque une modification des gradients ioniques parenchymateux mais aussi au niveau de la BHE, le transport des ions est alors favorisé par une altération précoce de celle-ci. Ce premier événement est suivi d'une perte plus prononcée de l'intégrité de l'endothélium capillaire. Ces deux phases induisent respectivement une variation des coefficients de réflexion σ_α et σ_p dont les valeurs tendent vers zéro, ce qui limite l'impact des gradients de pression osmotique puis oncotique. Le flux net est en faveur d'un mouvement d'eau et d'éléments sanguins vers le parenchyme cérébral conduisant à un œdème.

I.2 Structure des capillaires cérébraux

Les capillaires cérébraux sont constitués d'une monocouche de cellules endothéliales jointives reposant sur une membrane basale continue dans laquelle se trouve enchâssé, par endroits, un deuxième type cellulaire : les péricytes. Les capillaires ainsi constitués, sont entourés d'un manchon ininterrompu de pieds astrocytaires (figure 2).

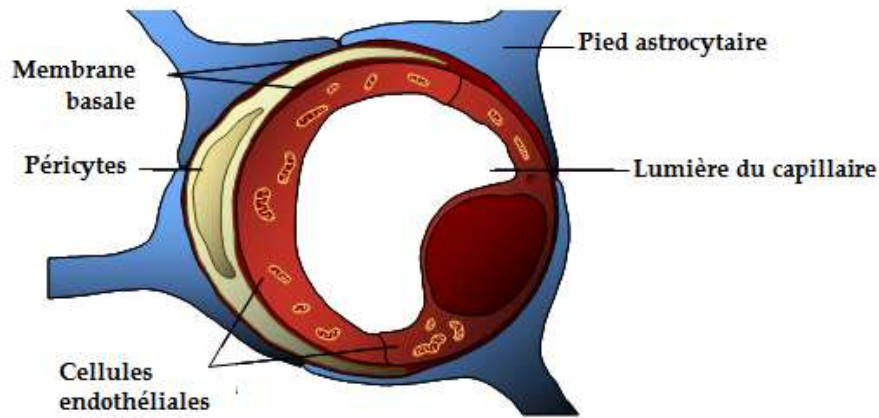


Figure 2 : Structure des capillaires cérébraux, modifié de (Delorme et al. 1968)

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, présentent des caractéristiques structurales et métaboliques qui différencient l'endothélium des capillaires cérébraux de celui des autres organes. Ces cellules sont polarisées et présentent des jonctions intercellulaires spécifiques. Elles sont riches en mitochondries qui représentent jusqu'à 10 % du volume intérieur de leur cytoplasme contre 2 à 5% dans les autres cellules endothéliales. Cette abondance de mitochondries assure la production d'énergie nécessaire au maintien de leurs caractéristiques structurales et de leur activité métabolique intense (Nag 2003a). Les cellules endothéliales cérébrales se caractérisent également par une faible densité de vacuoles d'endocytose (Begley and Brightman 2003) et par l'absence de canaux transendothéliaux (Reese and Karnovsky 1967). L'ensemble de ces propriétés concourt à restreindre les échanges entre le sang et le cerveau. Les cellules endothéliales sont totalement entourées par **la lame basale** qui leur sert de support. Cette lame basale est produite par les cellules qui y sont apposées: les cellules endothéliales et les péricytes (Mandarino et al. 1993). Elle est constituée d'un complexe protéique servant de support aux cellules. L'interaction des cellules avec la lame basale est importante pour le maintien de leur phénotype.

Les péricytes sont localisés au niveau de la membrane abluminale des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Ils sont entièrement enchâssés dans un dédoublement de la lame basale et possèdent de nombreux prolongements cytoplasmiques qui encerclent le capillaire. On considère que les péricytes émettent plus de 90 prolongements équivalents à une longueur de 300 nm à 800 nm pour 100 μm de capillaire. Les péricytes sont alors capables d'encercler entre 20% à 30% de la surface capillaire. Dans le cerveau, au niveau des capillaires, le ratio péricyte-cellule endothéliale est de 1 pour 3. On estime que la distance qui sépare ces deux types

cellulaires est de seulement 20 nm (Allt and Lawrenson 2001). Leur position au sein du capillaire laisse supposer que ces cellules y jouent un rôle majeur.

Les astrocytes forment un manchon continu autour des capillaires cérébraux par l'émission de prolongements occupants plus de 85% de la surface des capillaires (Fenstermacher et al. 1988). Ces prolongements de la membrane astrocytaire forment entre eux des jonctions de type gap et desmosome (Nakazawa and Ishikawa 1998). La proximité de ces pieds astrocytaires avec les cellules endothéliales suggère l'existence d'une communication spécifique entre ces deux types cellulaires. En effet, l'influence des astrocytes sur la différenciation des cellules endothéliales ainsi que sur la modulation des propriétés de perméabilité de la BHE ont été largement démontrées (Abbott 2002; Abbott et al. 2006; Abbott et al. 2009).

II Les propriétés restrictives de la BHE

Le rôle de la BHE est de contrôler la perméabilité vasculaire cérébrale afin de protéger le cerveau des composés potentiellement néfastes véhiculés par le sang. Pour cela l'environnement cérébral spécialisé permet d'établir les propriétés physiques et métaboliques spécifiques de la BHE.

II.1 Une barrière physique

II.1.1 Le complexe jonctionnel intercellulaire

L'espace interendothélial de la BHE est caractérisé par la présence d'un complexe jonctionnel incluant des jonctions adhérentes ainsi que des jonctions serrées qui s'organisent et se succèdent dans un ordre précis à partir de la lumière du capillaire afin de restreindre le passage paracellulaire de solutés (Bazzoni and Dejana 2004). La formation de ces complexes inclut l'interaction entre des protéines transmembranaires et des protéines cytosoliques reliées entre elles ainsi qu'au réseau d'actine intracellulaire (figure 3) (Wolburg et al. 1994; Huber et al. 2001; Wolburg and Lippoldt 2002; Hawkins and Davis 2005). L'ensemble des interactions au sein de ce complexe induit une polarisation des cellules endothéliales et forme une barrière limitant la libre circulation des lipides et des protéines entre la surface cellulaire apicale et basolatérale. De plus, ces jonctions jouent un rôle dans le transfert de signaux intracellulaires ainsi que dans de nombreuses fonctions cellulaires (croissance, apoptose, réorganisation du cytosquelette) (Dejana 2004).

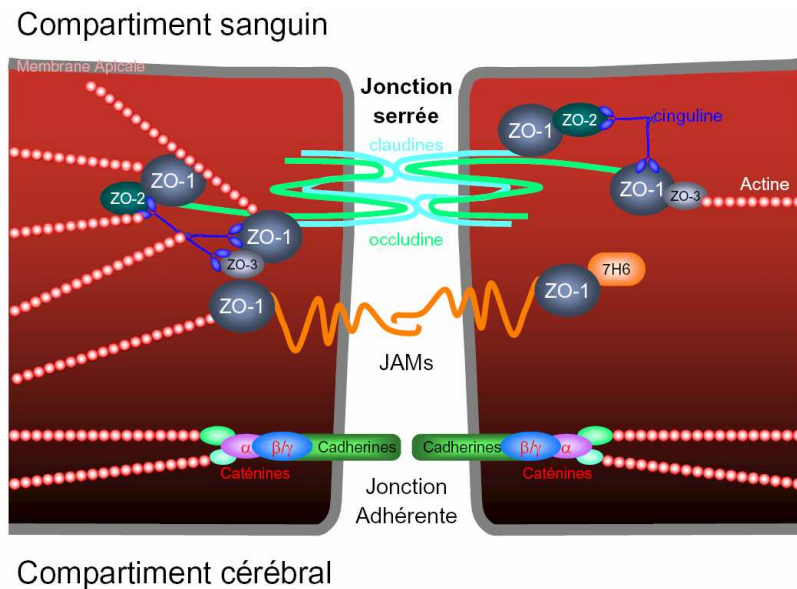


Figure 3 : Modèle des interactions entre les principales protéines des jonctions serrées, modifié de (Abbott et al. 2009).

Les jonctions serrées sont comprises dans une région riche en cholestérol de la membrane plasmique. Les claudines forment le squelette des jonctions serrées en formant tout comme l'occludine des dimères avec les claudines et l'occludine de la cellule adjacente. Les jonctions serrées consistent aussi en une série de protéines cytoplasmiques. Les protéines ZO servent de protéines de reconnaissance pour le placement des jonctions serrées et aussi de support pour les protéines de transduction du signal. 7H6 est une phosphoprotéine colocalisée avec ces jonctions. La cinguline est une protéine de type myosine double brin se liant préférentiellement à ZO-1 par sa partie globulaire. L'actine a des sites de liaison sur les ZO, l'occludine et les claudines. La jonction serrée repose sur une zone de contact intercellulaire, constituée par des molécules d'adhésions telles que les JAMs et la présence de jonctions adhérentes (cadhérines et caténines).

II.1.1.1 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont présentes de manière ubiquitaire le long de l'arbre vasculaire. Elles remplissent plusieurs fonctions, comme l'initiation et la stabilisation de l'adhésion cellule-cellule, la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine mais également la régulation de la signalisation intracellulaire. Elles représentent un premier contact entre les cellules endothéliales adjacentes préalablement nécessaire à la formation des jonctions serrées et à l'initiation de la polarisation cellulaire (Bazzoni and Dejana 2004).

Les cadhérines sont des glycoprotéines à un domaine transmembranaire qui interagissent de façon homotypique en présence de calcium afin de réguler l'adhésion cellulaire. Les cellules endothéliales expriment la cadhérine-5, encore appelée la Vascular Endothelial (VE)-cadhérine (Dejana et al. 1995). La VE-cadhérine est exprimée par les cellules endothéliales de l'ensemble du système vasculaire. Elle présente une homologie importante avec l'ensemble des cadhérines, et se lie *via* son extrémité carboxy terminale cytoplasmique aux caténines. La VE-cadhérine joue un rôle important dans la stabilisation des jonctions (Vestweber et al. 2009).

Les caténines représentent le lien permettant la communication entre les jonctions serrées et les jonctions adhérentes, mais également entre le complexe jonctionnel et le cytosquelette d'actine.

Au niveau de la BHE, la β -caténine et la plakiglobine (également appelée γ -caténine) relient les jonctions adhérentes à l'actine.

II.1.1.2 Les jonctions serrées

II.1.1.2.1 Les protéines transmembranaires

Les claudines :

Les claudines représentent une famille de 24 protéines transmembranaires de 18kDa à 27kDa. La structure des claudines comporte 2 boucles extracellulaires orientées vers l'espace intercellulaire qui interagissent (directement ou par l'intermédiaire d'une ou de plusieurs protéines) avec celles des claudines exprimées par la cellule adjacente, scellant ainsi l'espace intercellulaire. Son extrémité carboxy terminale cytoplasmique se lie directement à ZO-1 (zona occludens-1) qui est associé au cytosquelette d'actine.

La formation d'un dimère de claudines, par la liaison homotypique de claudines de cellules endothéliales adjacentes, forme un premier point d'ancrage qui initie la formation des jonctions serrées (Furuse et al. 1998). Toutes les cellules endothéliales expriment les claudines mais leur distribution est spécifique du tissu et varie le long de l'arbre vasculaire. L'endothélium cérébral de la BHE exprime les claudines-3, 5 et 12. (Morita et al. 1999; Nitta et al. 2003; Wolburg et al. 2003). La fonction des claudines au sein des jonctions serrées est d'établir le squelette initial pour la formation des jonctions serrées et de définir les propriétés imperméables des jonctions limitant ainsi la pénétration cérébrale aux molécules de faible poids moléculaire (Nitta et al. 2003).

L'occludine

L'occludine est la première composante protéique transmembranaire des jonctions serrées à avoir été identifiée (Furuse et al. 1993), c'est une phosphoprotéine d'approximativement 65kDa. L'occludine présente une organisation similaire de celle des claudines, mais cependant elle ne présente pas d'homologies de séquence avec celles-ci.

L'occludine possède une fonction de protéine régulatrice, puisque sa présence au sein des jonctions de la BHE est corrélée avec une augmentation de la résistance transendothéliale ainsi que la diminution de la perméabilité paracellulaire (Hirase et al. 1997). Cependant une étude menée chez la souris déficiente pour l'occludine démontre une organisation normale des jonctions serrées (Saitou et al. 2000), indiquant que celle-ci n'est pas nécessaire à la formation initiale des jonctions serrées mais intervient en tant que protéine régulatrice dans le maintien de

la structure. En effet, la localisation de l'occludine dépend de son état de phosphorylation. La forme non phosphorylée de l'occludine est localisée au niveau de la membrane basolatérale mais également dans des vésicules cytoplasmiques alors que la forme phosphorylée est retrouvée au sein des jonctions serrées (Sakakibara et al. 1997). L'ensemble de ces résultats démontre que l'occludine intervient dans la régulation des jonctions plutôt que dans l'établissement proprement dit des propriétés de barrière.

Les JAMs :

Les « junctional adhesion molecule » (JAM) appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Trois protéines JAM ont été identifiées dans des coupes de cerveau de rongeur. Ce sont de petites protéines localisées au niveau des jonctions serrées (Nasdala et al. 2002) et capables de se lier aux protéines ZO-1, cinguline, et AF6 *via* des domaines PDZ (PSD-95/dics-large/ZO-1 like protein) (Bazzoni et al. 2000). Le domaine PDZ est un domaine conservé particulier, également présent dans la structure des claudines, de l'occludine et des ZOs. Ce dernier permet une interaction entre les protéines du complexe jonctionnel possédant ce domaine particulier (Hawkins and Davis 2005). JAM-A établit des interactions homotypiques suggérant une action au niveau de l'adhésion cellulaire. Son expression au niveau des jonctions intercellulaires réduit la perméabilité paracellulaire (Martin-Padura et al. 1998). JAM-A est également capable d'établir des interactions hétérotypiques. La fonction de JAM-A serait associée à celle de PECAM-1 (Platelet endothelial cellular adhesion molecule-1) afin de réguler la transmigration des leucocytes (Martin-Padura et al. 1998).

II.1.1.2.2 Les protéines cytosoliques

Les « zonula occludens » protéines, ZO-1, ZO-2 et ZO-3 sont des protéines phosphorylées appartenant à la famille des guanylate kinases associées à la membrane (MAGUK, membrane-associated guanylate kinase). Elles comportent dans leur structure plusieurs domaines impliqués dans le couplage des protéines transmembranaires au cytosquelette *via* notamment le domaine PDZ (Nag 2003b).

ZO-1 est la première protéine associée aux jonctions serrées à avoir été identifiée (Stevenson et al. 1986). Elle interagit avec la claudine-5, JAM, l'extrémité carboxy terminale de l'occludine (Itoh et al. 1999) mais également avec ZO-2 et ZO-3. Sa présence au sein du complexe protéique est importante puisque cette protéine est essentielle à la stabilisation et à la fonction des

jonctions serrées. En absence de ZO-1, on mesure une augmentation de la perméabilité endothéliale (Abbruscato et al. 2002; Fischer et al. 2002; Mark and Davis 2002). ZO-1 joue également le rôle de molécule de signalisation, en effet elle est capable de se délocaliser dans le noyau dans les conditions de stress et de prolifération (Gottardi et al. 1996).

ZO-2 possède une structure similaire à celle de ZO-1, sa fonction est encore incertaine mais elle semble compenser l'absence de ZO-1 et faciliter la formation des jonctions serrées morphologiquement normales dans des cultures dépourvues de ZO-1 (Umeda et al. 2004).

La protéine **ZO-3** possède des homologies de séquence avec ZO-1 et ZO-2. Elle interagit directement avec ZO-1, la cinguline ainsi que le domaine cytoplasmique de l'occludine mais pas avec ZO-2 et relie ce complexe protéique à la myosine (Haskins et al. 1998). ZO-3 fait partie du complexe protéique favorisant la formation des jonctions serrées cependant son rôle exact au sein des jonctions n'est pas encore identifié.

La protéine 7H6 est une phosphoprotéine dont le poids moléculaire peut varier de 155 kDa à 175 kDa selon les espèces. Son état de phosphorylation détermine sa localisation au voisinage des jonctions serrées (Zhong et al. 1993). Elle est exprimée uniquement dans des cellules possédant des jonctions serrées. Elle présente un rôle majeur dans l'assemblage et la régulation de ces jonctions dans les cellules épithéliales et dans les cellules endothéliales de la BHE *via* une interaction directe avec ZO-1 (Satoh et al. 1996).

La cinguline est un dipeptide qui interagit *via* ses extrémités amino et carboxy terminales avec les ZO, JAM et la myosine (Cordenonsi et al. 1999). La cinguline aurait un rôle dans la transduction de la force mécanique générée par la contraction de l'actine et de la myosine, pouvant agir sur la perméabilité au niveau paracellulaire (Cordenonsi et al. 1999). Des études de microscopie électronique ont montré que la cinguline est localisée face cytoplasmique des jonctions serrées (Stevenson et al. 1989). Enfin, il a récemment été rapporté que la cinguline participe à la régulation de l'expression de la protéine ZO-2 (Guillemot and Citi 2006).

La phosphoprotéine géante AHNAK (700kDa) est capable de migrer du cytoplasme vers la membrane plasmique. Elle intervient dans la mise en place des contacts intercellulaires au sein des épithélia (Sussman et al. 2001). Une étude utilisant un modèle *in vitro* de BHE a démontré qu'elle est exprimée dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux où elle est associée à ZO-1 (Gentil et al. 2005).

Bien qu'elle ne soit pas définie comme une protéine de jonction serrée, **l'actine** fait partie du complexe jonctionnel et présente un rôle actif dans la régulation des jonctions serrées. La forme globulaire de l'actine polymérise sous forme de filaments, l'actine-F dont la dynamique donne

au cytosquelette une infrastructure nécessaire au maintien de la morphologie cellulaire. Les agents inflammatoires, le stress oxydant, les neutrophiles ont montré la redistribution de l'actine ainsi que sa polymérisation en forme de fibre de stress, en association avec une augmentation de la perméabilité de la BHE. Ceci suggère que la régulation de la fonction de barrière des cellules endothéliales impliquerait le réseau hautement dynamique des filaments d'actine (Lum and Roebuck 2001).

II.1.2 Les vésicules et les canaux trans-endothéliaux

Au niveau des capillaires cérébraux, des études réalisées *in vivo* montrent que les **vésicules de pinocytose**, impliquées dans le transport non spécifique de molécules du sang vers les tissus et représentant la voie principale de transport des protéines plasmatiques dans l'endothélium périphérique sont rares. De plus, les **canaux transendothéliaux** qui proviennent de la fusion de plusieurs vésicules (Simionescu and Simionescu 1991) et permettraient alors le transport non spécifique des molécules sont inexistantes (Delorme et al. 1968) (Reese and Karnovsky 1967).

Les jonctions serrées de la BHE ainsi que l'absence de vésicules et de canaux transendothéliaux établissent la barrière physique restreignant le passage au travers des cellules endothéliales, induisant une polarisation des membranes cellulaires. De plus, la BHE possède plusieurs propriétés métaboliques qui forment une barrière supplémentaire.

II.2 Une barrière métabolique

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux représentent une barrière métabolique par l'expression d'enzymes et de pompes d'efflux limitant ainsi fortement l'accès au SNC.

II.2.1 Les enzymes

Les monoamine oxydases (MAO A et MAO B) sont des enzymes présentes au niveau des tissus cérébraux (Lai et al. 1975). La MAO A est présente au niveau l'endothélium cérébral (Konradi et al. 1987). Elles dégradent les neurotransmetteurs monoaminergiques (dopamine, sérotonine, noradrénaline, adrénaline) libérés par les neurones et empêchent également le passage de leurs précurseurs (5-hydroxytryptophane et 3,4-dihydroxyphénylalanine) du sang vers le cerveau (Lai et al. 1975).

La gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT) représente l'enzyme la plus caractéristique de la BHE (Meyer et al. 1990). Elle est également présente et fonctionnelle au niveau des péricytes

(Frey et al. 1991) (Risau et al. 1992). Son activité permet de catalyser le transfert de résidus γ -glutamyl d'un peptide donneur (essentiellement le glutathion) à un peptide accepteur. En général, elle est apparentée au transport de nombreux acides aminés à travers la BHE. Par ailleurs, elle a été également décrite comme étant un neuroprotecteur. En effet, son activité enzymatique permet de lutter contre l'invasion cérébrale des leukotriènes C4 et par conséquent, elle contribue au maintien d'une faible perméabilité de la BHE (Black et al. 1994).

La phosphatase alcaline quant à elle hydrolyse les métabolites phosphorylés et contrôle le transport d'esters de phosphates et d'ions phosphates. Tout comme la γ -GT elle est abondante au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux (Meyer et al. 1990; Lawrenson et al. 1999).

L'expression de ces enzymes au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux est dépendante de la présence des astrocytes à proximité de ces cellules (Abbott et al. 1992).

II.2.2 Les pompes d'efflux

L'endothélium de la BHE présente un degré supplémentaire de protection de l'environnement cérébral par la présence de pompes d'efflux à la surface des cellules endothéliales. Elles participent à la **protection** et à la **détoxification** du SNC en limitant l'entrée des molécules potentiellement toxiques pour le cerveau (Cordon-Cardo et al. 1989). Elles assurent aussi l'efflux de substances thérapeutiques, qui ont alors du mal à parvenir à leur cible. Cette diminution de biodisponibilité des molécules participe au phénomène de **résistance multiple aux médicaments** (MDR : multidrug resistance).

La famille des **ABC transporteurs** représente une des plus large famille de protéines et comporte trois sous familles, **ABCB1** rapporté au nom de la **P-gp**, première pompe d'efflux à avoir été découverte, **ABCC** pour la sous famille des **MRPs** (multidrug resistance-associated protein) et enfin **ABCG2** pour la **BCRP** (Breast cancer resistance protein). Pour son fonctionnement, cette famille de pompes d'efflux nécessite l'apport d'énergie par l'hydrolyse de l'ATP (Loscher and Potschka 2005).

La P-gp (P-glycoprotéine) a été, en 1989, le premier ABC transporteur détecté chez l'homme au niveau des cellules endothéliales de la BHE (Cordon-Cardo et al. 1989; Thiebaut et al. 1989). Elle est codée par une famille multigénique dont les séquences sont hautement conservées. L'une des caractéristiques de la P-gp est sa grande variété de substrats tant du point de vue de leur

structure chimique, de leur masse moléculaire que de leur mécanisme d'action pharmacologique (Tableau 1).

Transporteur	Substrats	
	Classe thérapeutique	Exemples
P-gp (MDR1/ABCB1)	Anticancéreux	Doxorubicine, daunorubicine, vinblastine, vincristine, étoposide, paclitaxel, taxol, docétaxel, méthotrexate, mitoxantrone
	Opioides	Méthadone, loperamide, fentanyl
	Psychotropes	Amitriptiline, midazolam, risperidone, citalopram
	Anti-épileptiques	Phénytoïne, carbamazépine, lamotrigine, phénobarbital, felbamate
	Inhibiteurs de protéase du VIH	Amprenavir, indinavir, saquinavir, nelfinavir, nítonavir
	Antibiotique	Erytromycine, valinomycine, tétracyclines, fluoroquinolones
MRP1 (ABCC1)	Anticancéreux	Etoposide, vincristine, doxorubicine, daunirubicine, mathotréxate
	Inhibiteurs de protéase du VIH	Ritonavir, saquinavir
MRP 4 (ABCC4)	Anticancéreux	Méthotréxate, 6-mercaotopurine, thioguanine, topotécán
	Analogues nucléosidiques	Zidovudine, PMEÁ
MRP 5 (ABCC5)	Anticancéreux	Méthotréxate, 6-mercaotopurine, thioguanine
	Analogues nucléosidiques	PMEÁ
BCRP (ABCG2)	Anticancéreux	Doxorubicine, daunorubicinen étoposide, mitoxantrone, méthotréxate, prazosine, topotécán
	Analogues nucléosidiques	Zidovudine, lamivudine

Tableau 1 Tableau récapitulatif des substrats de certains ABC transporteurs présents au niveau de la BHE d'après Dauchy, S. 2008.

Son expression est retrouvée dans de nombreux tissus dans des conditions physiologiques, avec notamment un haut niveau d'expression dans les capillaires cérébraux (Cordon-Cardo et al. 1989). La mise en évidence de la P-gp au niveau de la BHE dans de nombreuses espèces (singe, chat, rat, souris, cochon et boeuf) suggère que celle-ci représente un mécanisme de défense de la BHE chez les mammifères. Elle est localisée sur la face luminale des cellules endothéliales (Bendayan et al. 2002; Czeredys et al. 2008), son expression est fonction de l'environnement cellulaire. En effet, l'expression génique et protéique de la P-gp dans les cellules endothéliales est renforcée par la co-culture avec les cellules gliales (Fenart et al. 1998; Berezowski et al. 2004a). A côté de cette expression majoritaire bien admise, la P-gp serait également présente, à un degré moindre, au niveau des astrocytes et des neurones (Pardridge et al. 1997; Golden and Pardridge 1999; Volk et al. 2005) mais cette localisation reste encore controversée (Schinkel 1999; Abbott 2002).

La seconde sous famille des ABC transporteurs est celle des **MRPs** (Multidrug Resistance-associated Proteins), elle comprend au moins neuf membres également détectés dans divers tissus sains chez les mammifères. Les MRP sont capables de transporter une large gamme de substrats ayant des structures chimiques et des propriétés pharmacologiques très diverses

(tableau 1) (Deeley et al. 2006). Dans les cellules endothéliales de la BHE six MRPs ont été rapportées dans de nombreuses espèces et notamment chez l'homme. En effet quatre MRPs (MRP-1, MRP-4, MRP-5 et MRP-6) ont été détectées dans les cellules endothéliales de BHE bovines mais également dans des homogénats de cerveau. Une étude menée sur les péricytes ainsi que sur les cellules gliales a montré que certaines MRPs sont également exprimées dans ces deux types cellulaires (Berezowski et al. 2004a) mais également dans les cellules microgliales, les neurones ainsi que les oligodendrocytes (Hirrlinger et al. 2002).

La BCRP (Breast Cancer Related Protein) doit son nom à sa découverte dans une lignée cancéreuse du sein. La distribution de la BCRP dans les différents tissus de l'organisme est voisine de celle de la P-gp, ce qui suggère que ces deux transporteurs pourraient agir de concert pour protéger les cellules contre les xénobiotiques dans de nombreux tissus (Schinkel and Jonker 2003). Au niveau de la BHE, la BCRP a été détectée dans des cellules endothéliales de capillaires cérébraux de porc (Eisenblatter and Galla 2002), de souris (Cisternino et al. 2004) et chez l'Homme. La BCRP pourrait apparaître comme un système compensatoire de la P-gp au niveau de la BHE, suggéré dans une expérience menée chez la souris déficiente en P-gp, où suite à l'inhibition de la P-gp, où une augmentation de l'expression de la BCRP a été mesurée (Cisternino et al. 2004).

II.3 Induction des propriétés de barrière physique et métabolique

II.3.1 Les péricytes

Découverts par Rouget en 1870, les péricytes sont des cellules périvasculaires adjacentes aux micro-vaisseaux cérébraux, qui appartiennent à la lignée des cellules musculaires lisses. Les péricytes sont en étroite association avec les cellules endothéliales suggérant l'implication des péricytes dans la physiologie des capillaires cérébraux ainsi que dans l'induction et le maintien des propriétés de la BHE (Lai and Kuo 2005).

Les péricytes régulent de nombreuses fonctions vasculaires (Fisher 2009). Ils présentent tout d'abord un rôle dans **l'angiogénèse**. En effet, l'initiation du processus de maturation des vaisseaux néoformés coïncide avec l'interaction des cellules endothéliales avec les péricytes (Risau 1995), qui sont capables d'inhiber la prolifération des cellules endothéliales par inhibition de contact *via* la production de PDGF (Benjamin et al. 1998).

L'implication des péricytes dans **l'induction des propriétés de BHE** a été mise en évidence par des études *in vitro* montrant que l'ajout de péricytes dans une culture de cellules endothéliales provoque la formation de structure de type capillaire (Ramsauer et al. 2002) et induit également

les propriétés de BHE (Nakagawa et al. 2007). Les péricytes sont également impliqués dans le **maintien des propriétés de BHE**, en maintenant notamment la faible perméabilité endothéliale. Des observations faites *in vivo* montrent que le degré d'imperméabilité de l'endothélium vasculaire augmentent avec le ratio péricytes/cellules endothéliales (Frank et al. 1987; Sims 1991; Shepro and Morel 1993). Cette régulation s'effectuerait par **stabilisation des jonctions serrées** entre les cellules endothéliales de capillaires cérébraux. En effet, l'angiopoïétine-1 produite par les péricytes est capable d'induire l'expression de transcrits d'occludine dans des cellules endothéliales (Hori et al. 2004; Lai and Kuo 2005). Ces résultats sont corrélés avec une étude *in vivo* montrant que l'absence de péricytes au niveau des capillaires cérébraux induit une augmentation de la perméabilité vasculaire *via* une altération de la structure du complexe jonctionnel (Hellstrom et al. 2001). Les péricytes participeraient également à la formation de la lame basale par la synthèse du collagène de type IV, de glycosaminoglycanes et de laminine (Allt and Lawrenson 2001; von Tell et al. 2006).

Par ailleurs, **les péricytes semblent également participer aux propriétés métaboliques de la BHE**, en induisant la ré-expression d'enzymes dans les cellules endothéliales (Ramsauer et al. 1998) ou en renforçant l'expression de certaines pompes d'efflux (Berezowski et al. 2004a).

Ces travaux suggèrent que l'intercommunication entre les péricytes et les cellules endothéliales intervient dans la physiologie des capillaires cérébraux.

II.3.2 Les astrocytes

La position stratégique et omniprésente des astrocytes suscite depuis longtemps un grand intérêt dans l'identification du rôle de ces cellules au sein de l'UNGV. Ils sont en contact avec l'ensemble des types cellulaires présents au sein de l'UNGV, ils représentent le lien permettant l'intercommunication au sein de cette unité. Les astrocytes seuls sont capables d'influencer les propriétés de la BHE ou alors en tant qu'intermédiaire entre les neurones et les cellules endothéliales.

En effet, concernant l'implication des astrocytes dans les propriétés de la BHE, (Delorme et al. 1968) ainsi que (Wolff et al. 1998) ont été les premiers à observer que l'établissement de la BHE au cours du développement, coïncide avec la formation des manchons astrocytaires et de la lame basale autour des capillaires cérébraux. Par la suite, l'influence des astrocytes sur les propriétés de la BHE a été étudiée *in vitro* grâce à des modèles de co-cultures cellulaires utilisant des cellules endothéliales cultivées sur filtre en présence d'astrocytes ou de milieu conditionné d'astrocytes. Ces expériences ont démontré la capacité des astrocytes à induire les propriétés de

BHE (Dehouck et al. 1990) (Rubin et al. 1991) (Raub et al. 1992); en renforçant les jonctions serrées (Dehouck et al. 1990) (Wolburg et al. 1994), ou encore l'expression de pompes d'efflux comme la P-gp et certaines MRPs (Berezowski et al. 2004a). En effet, les astrocytes sont présents au contact de l'endothélium des péricytes et des neurones *via* l'émission de prolongements cytoplasmiques appelés pieds astrocytaires. L'implication des astrocytes au sein de l'UNGV passe par l'induction et le maintien des propriétés de BHE des cellules endothéliales (Abbott 2002; Abbott et al. 2006) (Abbott et al. 2009). **Les astrocytes sont capables de réguler la perméabilité microvasculaire** en agissant seuls ou de concert avec les neurones (Abbott 2002; Ballabh et al. 2004). Les astrocytes seuls sont également capables d'influencer l'établissement des propriétés de BHE en modulant notamment la perméabilité vasculaire *via* une régulation de la composition de la matrice extracellulaire par exemple (del Zoppo and Milner 2006).

II.3.3 La lame basale

La membrane basale est une matrice extra cellulaire spécialisée qui interagit avec les cellules endothéliales, les péricytes ainsi que les astrocytes qui la synthétisent. Elle forme un réseau extracellulaire continu à la périphérie de ces cellules qui atteint à l'âge adulte une épaisseur de 30 à 40 nm (Farkas and Luiten 2001).

Ce réseau protéique est composé essentiellement de collagène de type IV, de laminine, de fibronectine, de nidogène, d'entactine et de protéoglycanes notamment de l'héparane sulfate. Il présente des charges anioniques portées, d'une part, par des protéoglycanes riches en héparanes sulfates et d'autre part, par des glycoprotéines riches en acides sialiques (Nag 2003b).

La membrane basale possède un **rôle structural au niveau de la BHE**. Elle permet la communication et la signalisation entre les différents types cellulaires (Tilling et al. 2002). Elle sert également de système d'ancrage aux cellules endothéliales *via* l'interaction des protéines notamment la laminine avec les intégrines présentes au niveau de l'endothélium (Hynes 1992).

En plus de ce rôle structural, des expériences réalisées *in vitro*, montrent que les composants de la lame basale exercent une **influence sur la différenciation des cellules endothéliales** en induisant notamment la formation des jonctions serrées (Tilling et al. 1998). La perte de la stabilité de la lame basale sous l'effet de métalloprotéases ou de collagénases est fréquemment impliquée dans les manifestations pathologiques à l'origine de la rupture de la BHE (Gasche et al. 2006). Bien que les jonctions serrées constituent le principal complexe restreignant la perméabilité endothéliale, les protéines de la lame basale contribuent à maintenir l'intégrité de cette structure.

III Une barrière sélective

Les propriétés physiques et métaboliques de la BHE créent une interface à haute résistance transendothéliale de faible perméabilité. Seules les substances aux propriétés lipophiles ainsi que des petites molécules comme le dioxygène et le dioxyde de carbone peuvent diffuser au travers de la membrane endothéliale selon leur gradient de concentration (Grieb et al. 1985).

Le passage des ions, des nutriments et des macromolécules nécessite un système de transport facilité ou dépendant de l'énergie nécessitant une répartition asymétrique des récepteurs et des transporteurs de part et d'autre de la membrane endothéliale (figure 4).

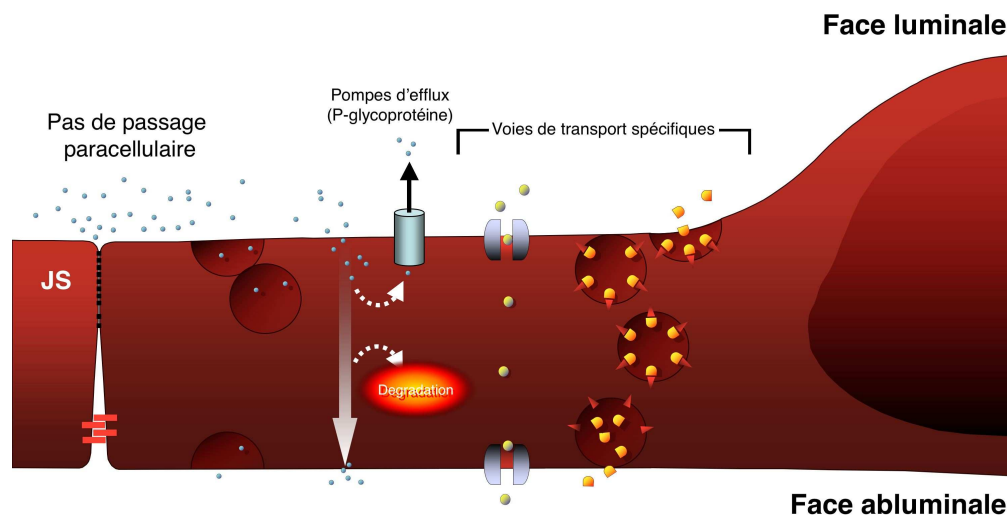


Figure 4 : Les différentes voies de transport au travers de l'endothélium de la BHE.

III.1 Le transport des nutriments

Le transport de l'eau a un rôle central dans la physiologie du cerveau. Dans les conditions physiologiques, les neurones relarguent des neurotransmetteurs et échangent du potassium (K^+) contre du sodium (Na^+). Pour ce faire l'énergie apportée par le métabolisme du glucose génère des mouvements d'eau à raison de $28 \text{ nl.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (Rapoport 1976). Les neurotransmetteurs sont recyclés, alors que l'eau présente dans le parenchyme cérébral doit être éliminée. La répartition des ions, indispensables à l'activité neuronale et au fonctionnement de nombreux canaux et transporteurs, est alors indéniablement liée à l'homéostasie de l'eau. Une famille de canaux d'environ 30 kDa appelés aquaporines (AQP) facilite le flux d'eau ou de glycérol (aquaglycéroporines) au travers de membranes de nombreux types cellulaires (Badaut et al. 2002). Les aquaporines représentent une famille de protéines transmembranaires formant un pore de perméabilité de 3 à 6 Å de diamètre (figure 5). Le transport bidirectionnel de l'eau s'effectue en suivant les principes physiques de l'osmolarité.

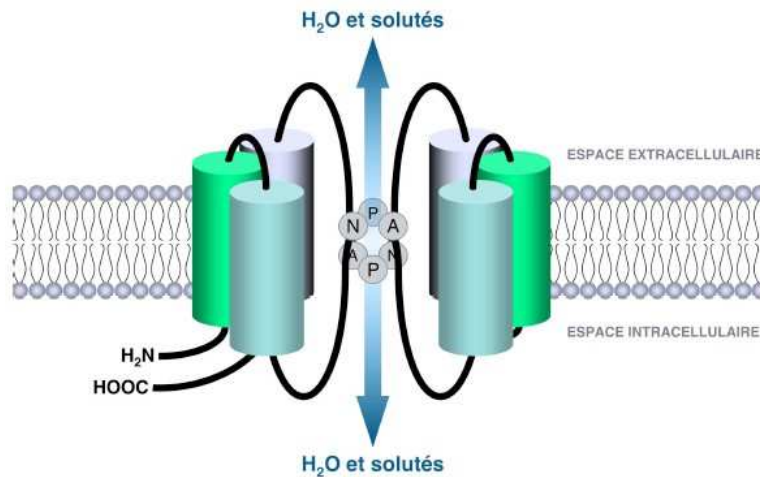


Figure 5 : Structure générale des aquaporines, modifié de (Badaut et al. 2002).

Les aquaporines sont formées d'un double tandem de 3 hélices α transmembranaires. Deux boucles connectées, contenant chacune un motif Asn-Pro-Ala (NPA), forment un pore dans la membrane plasmique.

Au niveau de la BHE, l'AQP-4 est l'aquaporine la plus abondante et largement exprimée par les astrocytes. Elle présente une localisation polarisée au niveau des pieds astrocytaires en contact avec les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Nielsen et al. 1997) et en étroite association avec le transport des ions K^+ (Wolburg et al. 2009). Contrairement aux autres aquaporines, l'AQP-4 a la particularité de ne pas être inhibée par l' $HgCl_2$, elle est de ce fait considérée comme constitutivement activée (Hasegawa et al. 1994).

L'utilisation de souris invalidées pour le gène de l'AQP-4 a permis de suggérer son rôle potentiel dans les conditions pathologiques. L'AQP-4 présenterait deux effets lors de la formation de l'œdème. En effet, dans une phase précoce, l'AQP-4 faciliterait la formation de l'œdème cytotoxique (Manley et al. 2000). Cependant l'augmentation de l'expression de l'AQP-4 lors de l'œdème vasogénique pourrait faciliter l'élimination de l'excès d'eau présent dans le parenchyme cérébral (Papadopoulos et al. 2004). De plus, le transport de l'eau est associé à l'homéostasie ionique et notamment le potassium, l'insertion de l'AQP-4 au sein de la membrane démontre une association complexe avec les canaux potassique Kir (inwardly rectifying K^+ channel) (Wolburg et al. 2009). Cependant, bien que l'implication de l'AQP-4 dans les mouvements d'eau soit admis, son rôle exact dans la formation de l'œdème fait encore débat. De plus, aucune étude n'a encore réussi à déterminer le lien temporel entre l'activation des aquaporines et la rupture de la BHE.

Le transport des ions est également un processus important au niveau de l'UNGV, il est directement lié à l'activité neuronale mais également à l'activité des cellules endothéliales de la

BHE. Il nécessite l'expression de canaux ioniques localisés au niveau des membranes lumineale et abluminale des cellules endothéliales de la BHE (figure 6).

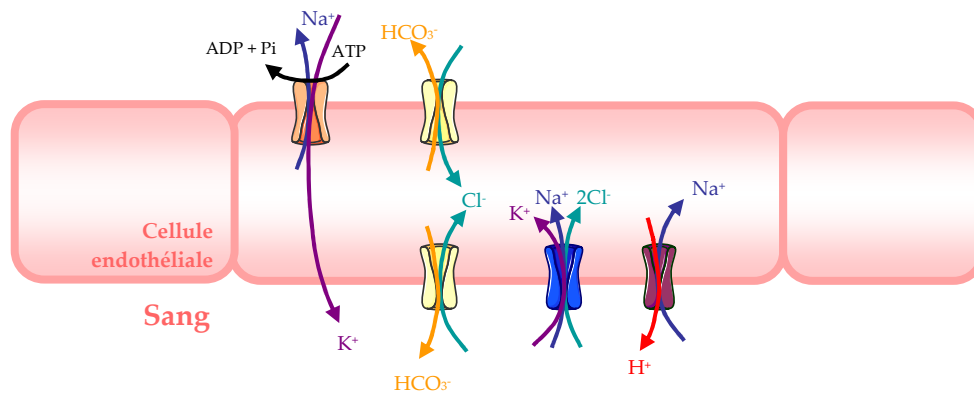


Figure 6 : Transport ionique au travers de la BHE modifié de (Zlokovic 2008).

Le **potassium** doit être maintenu à une concentration stable au niveau du liquide interstitiel cérébral (2,8mM). Cette concentration est régulée par élimination de l'excès au niveau astrocytaire (Kimelberg et al. 1979) et par un transport du cerveau vers le sang plus important que le transport dans le sens sang cerveau.

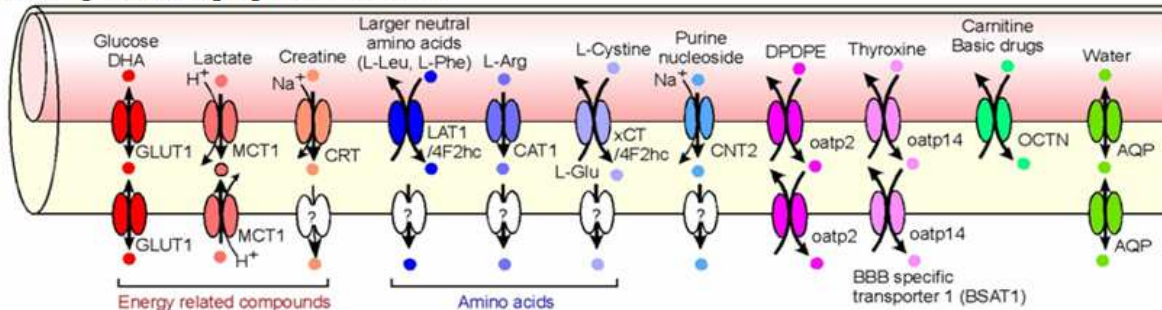
Un **gradient de sodium** est présent entre le sang et le cerveau. Ce gradient est essentiel pour le fonctionnement des co-transporteurs nécessitant du Na^+ ainsi que pour l'homéostasie calcique. Le **calcium** est un second messager impliqué dans de nombreux processus comme la régulation des jonctions serrées (Hawkins and Davis 2005) et le couplage neurovasculaire (Filosa et al. 2004), il est de ce fait maintenu à une faible concentration intracellulaire. De plus, le maintien du gradient de sodium est essentiel pour l'expulsion des acides aminés non essentiels et toxiques.

L'homéostasie des ions K^+ et des ions Na^+ est maintenue par une pompe Na^+/K^+ ATPase (Bradbury and Stulcova 1970) ainsi qu'un symporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ présents au niveau de la BHE (Vigne et al. 1994).

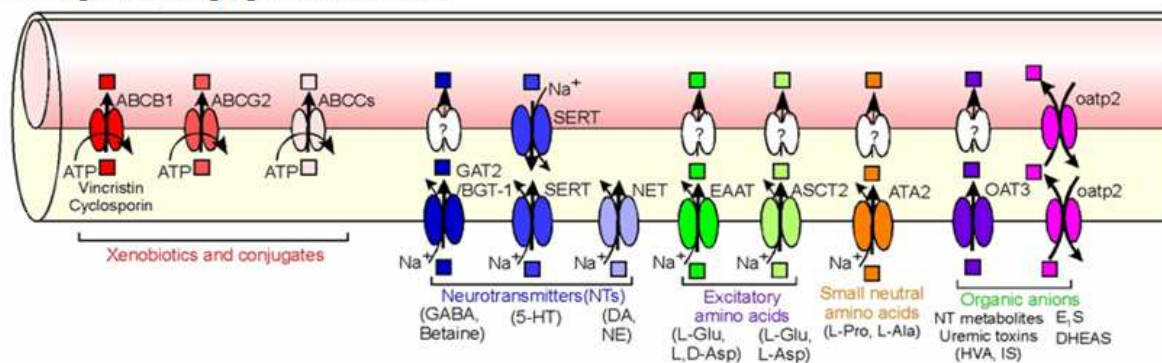
D'autres transports sont également présents au niveau de la BHE, ils sont impliqués dans la **régulation du pH intracellulaire** : un échangeur Na^+/H^+ est présent au niveau de la membrane basale, et un échangeur $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ sur les deux faces de l'endothélium cérébral (Taylor et al. 2006).

Un système complexe de transporteurs et de récepteurs est impliqué dans l'influx, l'efflux ainsi que le transport des peptides et des protéines, réparti de manière asymétrique sur les faces luminale et abluminale de cellules endothéliales (figure 7).

A. Transporteurs impliqués dans l'influx



B. Transporteurs impliqués dans l'efflux



C. Transporteurs des peptides et des protéines

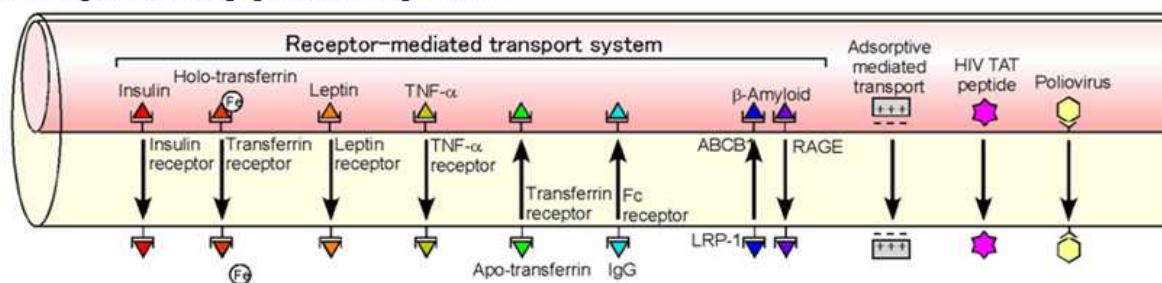


Figure 7 : Localisation des transporteurs impliqués dans l'influx et l'efflux ainsi que dans le transport des peptides et des protéines au niveau de la BHE, modifié de (Ohtsuki and Terasaki 2007).

Les transporteurs d'anions organiques comme les OATs (Organic Anion Transporters) et OATPs (Organic Anion Transporting Polypeptide) appartiennent à la famille des « Solute Carrier transporters » (SCL). Ils fonctionnent généralement comme des échangeurs, le transport est bidirectionnel, dont le sens dépend du gradient de concentration de la molécule à échanger. Ils transportent des acides biliaires, des colorants organiques, les hormones thyroïdiennes, les oligopeptides anioniques et également des xénobiotiques (pour revue (Hagenbuch and Meier 2003)). L'OAT-3 a été localisé par immunocytochimie à la face abluminale des cellules

endothéliales de capillaires cérébraux chez le rat et la souris (Ohtsuki et al. 2004; Ohtsuki and Terasaki 2007).

L'**Oatp2** a été identifié en co-localisation avec le facteur endothélial de Von Willebrand, dans l'endothélium des capillaires cérébraux (Gao et al. 1999). L'**OATP-1** est également exprimé à la face luminale des cellules endothéliales de capillaires cérébraux (Gao et al. 1999; Gao et al. 2000) alors que l'**oatp1** a été localisé *in vitro* au niveau des membranes lumineales et ablumineales des cellules endothéliales cérébrales (Bronger et al. 2005). L'expression de trois autres transporteurs, OATP-A, oatp-3 et oatp-14, a été retrouvée au niveau de la BHE, chez l'homme, la souris et le rat respectivement (Gao et al. 2000; Sugiyama et al. 2003; Ohtsuki et al. 2004).

Bien que la localisation précise des SLC ne soit pas encore très bien établie, le fonctionnement des transporteurs d'efflux SLCs semble agir de concert avec les transporteurs d'efflux ABC, dans le cadre d'une détoxification du SNC (Kusuhara et al. 1998).

Le transport du glucose est d'une importance particulière pour l'activité cérébrale puisque le glucose représente la source majeure d'énergie (Simpson et al. 2007). Pour maintenir le métabolisme aérobie et l'homéostasie neuronale, une régulation fine de l'apport cérébral en glucose est nécessaire et s'effectue *via* un transport facilité. GLUT-1 (glucose transporter-1) est le transporteur majoritairement exprimé au niveau de la BHE (figure 7). Ce transporteur présente une distribution asymétrique au sein des cellules endothéliales de la BHE avec une densité plus importante au niveau de la membrane abluminale (le ratio membrane abluminale : luminale est de 3 pour 1). L'expression et la distribution de GLUT-1 sont sensibles à l'environnement sanguin et cérébral. On observe notamment sa redistribution au sein des membranes dans le cas de l'hypoglycémie (Simpson et al. 1999) ainsi qu'une modification de son activité ou de son incorporation au sein des membranes lors d'une augmentation de l'activité neuronale (Leybaert 2005).

Le transport des acides aminés est d'une grande importance au niveau du système nerveux puisqu'ils interviennent dans la synthèse des neurotransmetteurs. Le transport des acides aminés s'effectue par deux classes de transporteurs caractérisés par leur spécificité de substrat et leur dépendance au sodium (Hawkins et al. 2006). **Le premier système de transport facilité indépendant du sodium** est présent au niveau des membranes lumineales et ablumineales (L1, γ^+ , n et α_G). **Le second** est exclusivement localisé sur la membrane abluminale des cellules endothéliales et **nécessite la présence de sodium** (LNAA, N, EAAT, T, A et ASC $B^{0,+}$) (figure 7). Le système ASC/ $B^{0,+}$ transporte également la carnitine au niveau de la membrane luminale des

cellules endothéliales de la BHE (Mroczkowska et al. 1997; Czeredys et al. 2008). Un second transporteur de la carnitine est présent au niveau de la membrane abluminale, l'OCTN2 (Novel Organic Cation Transporter), un transporteur de cations organiques dépendant du sodium (Berezowski et al. 2004b; Miecz et al. 2008).

Le transport des acides monocarboxyliques s'effectue *via* le transporteur MCT-1 (monocarboxylate transporter-1), présent sur les faces luminale et abluminale des cellules endothéliales (figure 7). Il permet de transporter notamment le lactate et les corps cétoniques qui représentent une source d'énergie pour le cerveau dans des situations particulières (jeûne, allaitement). Les concentrations plasmatiques en substrat régulent l'expression de MCT-1 (Simpson et al. 2007).

III.2 Transport des macromolécules et des particules

A la différence des autres mécanismes permettant un transport rapide de l'ordre de la milliseconde, le transport des macromolécules par transcytose est lent avec une vitesse de l'ordre de la minute à l'heure. Cette voie de transport est minoritaire et concerne les protéines de haut poids moléculaire.

La transcytose est une voie de transport au travers des cellules qui nécessite plusieurs étapes, la **liaison à la membrane** qui s'effectue par liaison électrostatique ou spécifique (médiée par un récepteur) à la surface de la cellule, la formation d'une vésicule par invagination de la membrane cellulaire pour l'**endocytose** du composé et enfin l'**exocytose** pour le relargage du contenu de la vésicule au pôle opposé de la cellule. L'**endocytose adsorptive** permet à des protéines de haut poids moléculaire chargées positivement de traverser les membranes après liaison non spécifique par des interactions électrostatiques avec des sites anioniques qui sont des glycoprotéines présentes sur la membrane luminale des cellules endothéliales de la BHE (Tamai et al. 1997; Scherrmann 2002; Herve et al. 2008). Ce type de transport concerne notamment l'albumine (Scherrmann 2002). L'**endocytose médiée par un récepteur** nécessite la liaison spécifique du ligand avec son récepteur. Les complexes ligand-récepteur se concentrent dans les régions de la membrane qui s'invaginent en vésicules dans la cellule.

Un premier type de vésicule existe pour l'invagination des complexes ligand-récepteur, ce sont les puits recouverts de clathrine. La clathrine est un hexamère d'environ 650 kDa constitué de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères qui s'assemblent spontanément en triskèle autour de vésicules qui apparaissent denses aux électrons (figure 8) (Johannes and Lamaze

2002). La voie des vésicules recouvertes de clathrine dirige les molécules comme les lipoprotéines vers la dégradation lysosomiale (Anderson et al. 1977). Le diamètre de ces vésicules varie de 100 à 150 nm.

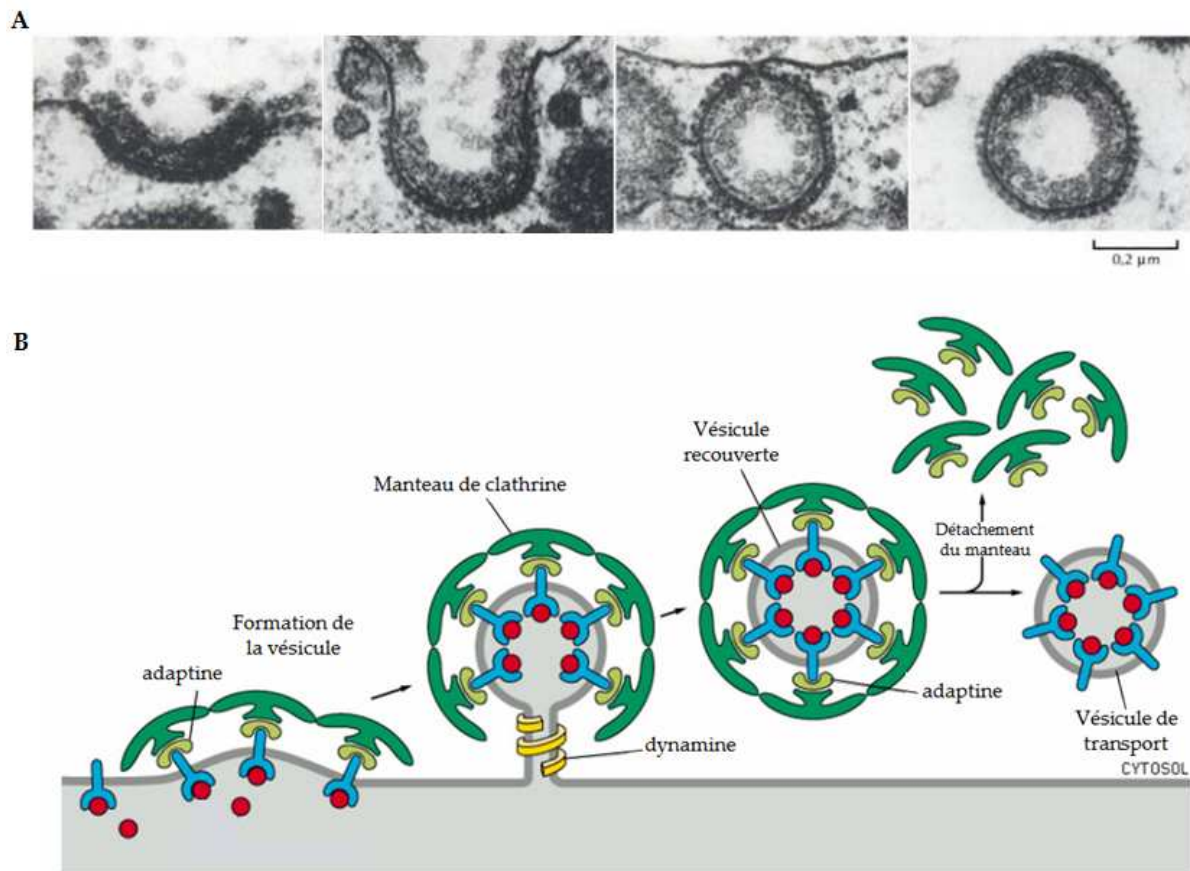


Figure 8 : Modèle d'assemblage et dissociation de vésicules recouvertes de clathrine au niveau de la membrane cellulaire lors d'une endocytose dépendante d'un récepteur.

A. Illustration de microscopie électronique de la formation d'une vésicule recouverte de clathrine pour l'entrée des lipoprotéines du vitellus dans un ovocyte de poule, barre= 0,2µm (Perry and Gilbert 1979). Les complexes ligand-protéine se concentrent à la surface externe de la membrane, formant ensuite un puits tapissé au niveau de la membrane qui apparaît dense aux électrons

B. mécanisme de formation des vésicules de clathrine. Le complexe ligand récepteur se concentre au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique. Ces complexes vont permettre le recrutement de la clathrine qui forme une enveloppe externe au niveau des puits d'endocytose. Les puits recouverts de clathrine s'invaginent et de la dynamine est recrutée au niveau du col (constriction) de la vésicule. Le détachement des vésicules recouvertes de clathrine est réalisé grâce à la fonction GTPasique de la dynamine. Après leur libération, les vésicules perdent rapidement leur clathrine sous l'effet d'une ATPase. La clathrine et les adaptines sont alors recyclées vers la membrane plasmique et participent à la formation de nouvelles vésicules. Les vésicules dépourvues de manteau vont alors fusionner avec un endosome. Source : essentiel cell biology, Garland edition.

Le pourcentage de la membrane plasmique recouverte de clathrine a été estimé à 2% de sa surface totale (Robinson 1994). Contrairement à certains types cellulaires tels que les hépatocytes, les endothélia de type continu renferment peu de vésicules recouvertes de clathrine (Schnitzer et al. 1994).

Un second type de vésicule existe pour l'internalisation des complexes ligand-récepteur, les **cavéoles**. Elles représentent une invagination membranaire impliquant la présence de protéines

appelées les cavéolines et dont la cavéoline-1 semble être l'élément majoritaire. Ces invaginations sont sensibles à la composition lipidique de la membrane, elles se forment dans des régions riches en cholestérol, en sphingolipides et en cavéoline-1 (figure 9) (Lajoie and Nabi 2007). Ce type de transport concerne les protéines de hauts poids moléculaire, comme la transferrine (Moos and Morgan 2000), les LDLs (low density lipopolyproteins), la leptine et l'insuline. L'utilisation d'un modèle *in vitro* de BHE a permis de montrer que les cavéoles sont impliquées dans le transport des LDL au travers de la BHE (Dehouck et al. 1997; Candela et al. 2008). En effet, les LDLs transportent les acides gras et le cholestérol dans la circulation sanguine. Après le tissu adipeux, le cerveau est l'organe le plus riche en lipides. Les lipides présents au niveau du SNC sont essentiellement du cholestérol et des acides gras (AG) poly-insaturés, tels que les AG essentiels acide arachidonique et acide docosahexaénoïque (DHA). Le récepteur des LDLs, apo B/E dont l'expression est modulée par la présence des astrocytes (Dehouck et al. 1994) a été mis en évidence (Méresse et al. 1989). Ces travaux indiquent que la transcytose des LDLs médiée par le récepteur apo B/E implique la voie des cavéoles et pourrait représenter une voie d'apport du cholestérol, des AG poly-insaturés et d'autres lipides au niveau du SNC (Candela et al. 2008).

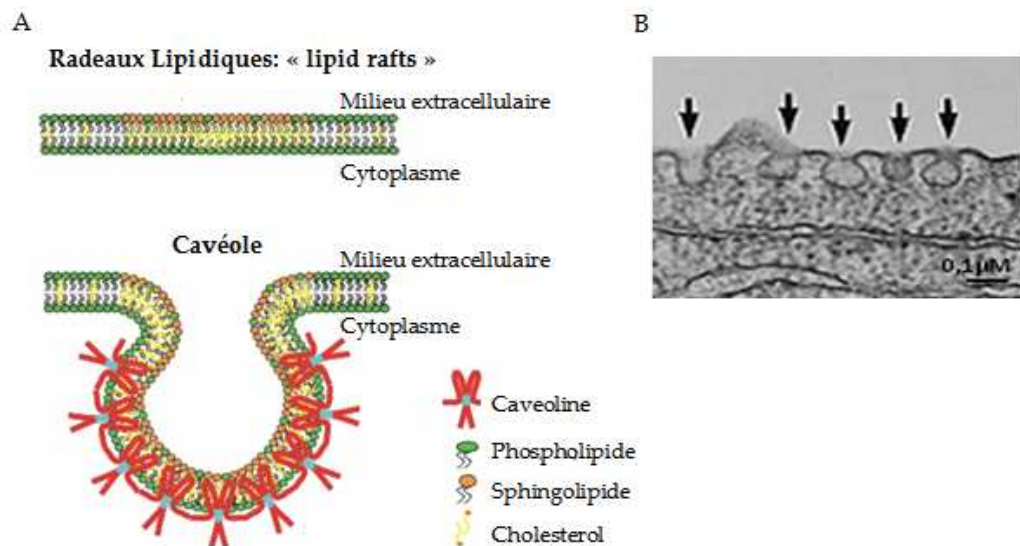


Figure 9 : Les cavéoles. Schéma de la formation d'une cavéole qui provient de l'invagination d'un segment membranaire de composition lipidique particulière appelé radeau lipidique grâce à la cavéoline (Razani et al. 2002) (A), Illustration de microscopie électronique de cavéoles (indiqué par les flèches) d'une cellule endothéliale de capillaires cérébraux de bœuf cultivée *in vitro* (B) (Candela et al. 2008), barre =0,1µm.

De plus, des résultats similaires ont été obtenus pour la transcytose de la transferrine et de la lactoferrine qui empruntent également la voie des cavéoles par l'intermédiaire d'un récepteur

(Descamps et al. 1996; Fillebeen et al. 1999). Cependant, la cavéoline-1 serait également impliquée dans des processus de signalisation ainsi que dans la régulation des propriétés de la BHE. En effet, la cavéoline-1 modulerait les jonctions serrées (Song et al. 2007) ainsi que l'activité de pompes d'efflux comme la P-gp (Jodoin et al. 2003).

IV L'unité neuroglivovasculaire

IV.1 Le couplage métabolique neurovasculaire

Sans réserves énergétiques, les neurones ont besoin d'un apport constant de glucose provenant de la circulation cérébrale qui représente 15% de la circulation sanguine générale (Williams and Leggett 1989).

La relation neurone/cellule endothéliale est alors cruciale pour la fonction neuronale puisque l'on estime que chaque neurone possède son propre capillaire (Girouard and Iadecola 2006). La microcirculation cérébrale se doit d'être fortement sensible aux besoins du tissu qu'elle approvisionne. Il existe une relation étroite entre ces deux composantes appelée le **couplage neurovasculaire**. Ce couplage entre le débit sanguin cérébral et l'activité régionale du tissu nerveux est d'ailleurs à la base de la neuroimagerie fonctionnelle (Buxton and Frank 1997) où la réponse hémodynamique de l'activation cérébrale appelée hyperhémie fonctionnelle, reflète l'activité neuronale.

D'un point de vue anatomique, il existe des interconnexions présentes entre la composante vasculaire et le parenchyme cérébral. Les larges artères cérébrales présentes à la surface du cerveau se divisent en artères en plongeant dans le parenchyme séparées du cerveau par l'espace de Virchow-Robin. Cet espace disparaît progressivement lorsque plus profondément, les vaisseaux deviennent des artérioles et des capillaires intra-parenchymateux. La membrane basale, les cellules musculaires lisses, les péricytes sont alors en contact directement avec les prolongements neuronaux et les pieds astrocytaires (figure 10).

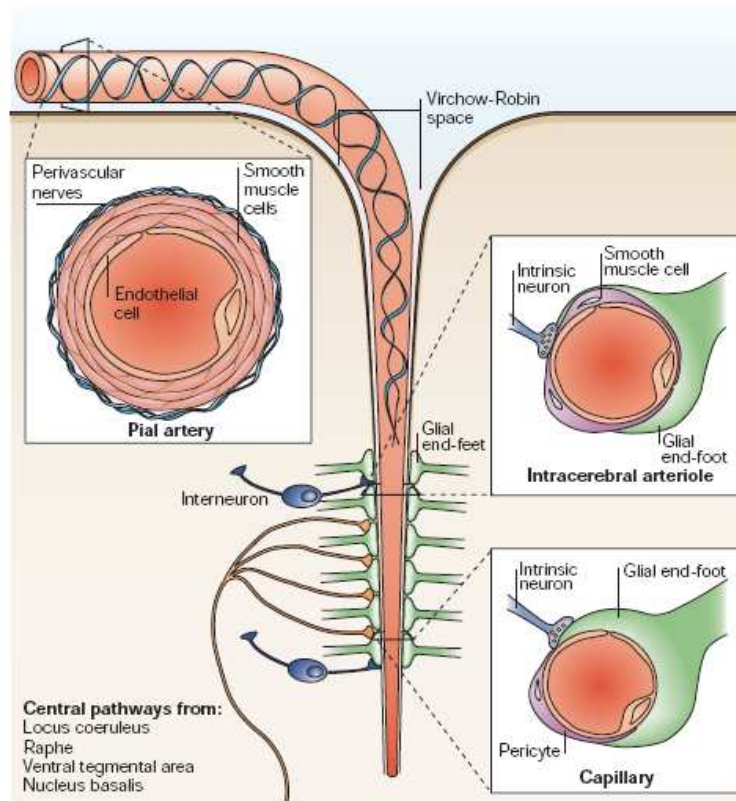


Figure 10 : Les interactions cellulaires au sein de l'unité neurovasculaire de (Iadecola 2004). L'unité neurovasculaire comporte une composante vasculaire représentée par les cellules endothéliales des micro-vaisseaux cérébraux associées aux péricytes ou cellules musculaires lisses. La seconde composante est constituée de cellules gliales représentées par les astrocytes émettant des prolongements continus entourant les cellules endothéliales appelés pieds astrocytaires ainsi que des cellules microgliales qui sont les cellules de l'immunité au sein du SNC. Enfin cet ensemble est en intercommunication avec la composante nerveuse représentée par les neurones.

De récentes avancées dans la neurobiologie cérébro-vasculaire démontrent que les réponses hémodynamiques induites par les modulations de l'activité neuronale requièrent des mécanismes de signalisation complexes impliquant non seulement les neurones et les cellules endothéliales mais également les astrocytes. Il a d'ailleurs été suggéré que les astrocytes joueraient le rôle d'intermédiaire entre les cellules endothéliales et les neurones (Zonta et al. 2003; Koehler et al. 2006; Iadecola and Nedergaard 2007; Blanco et al. 2008; Koehler et al. 2009). Les astrocytes sont en étroite relation avec les neurones, ils assurent le rôle de support énergétique en stockant l'énergie nécessaire à l'activité neuronale sous forme de glycogène. Le métabolisme glucidique est corrélé avec l'activité neuronale par **couplage métabolique** (Magistretti and Pellerin 1999). Les astrocytes sont également capables de réguler le taux de neurotransmetteurs en captant le glutamate au niveau de l'espace synaptique et de former une réserve sous forme de son précurseur, la glutamine (Schousboe et al. 2007) (Iadecola and Nedergaard 2007). De plus les astrocytes sont en étroite association avec les cellules endothéliales et sont capables d'en moduler les propriétés (Abbott 2002).

Durant la transmission synaptique, les neurones et les astrocytes libèrent des neurotransmetteurs vasoactifs comme l'acétylcholine, le GABA, les cathécholamines et des neuropeptides. D'autres neurotransmetteurs, comme le glutamate, n'ont pas de propriétés vasoactives directes mais stimulent la synthèse et la libération de puissants vasodilatateurs comme le NO et les métabolites des époxygénases P450 et des cyclooxygénases-2 (COX2) tant au niveau neuronal qu'astrocytaire (Iadecola 2004). D'autres médiateurs, différents des neurotransmetteurs, agissent au niveau de l'UNGV comme l'adénosine, ainsi que les ions K^+ et H^+ (figure 11).

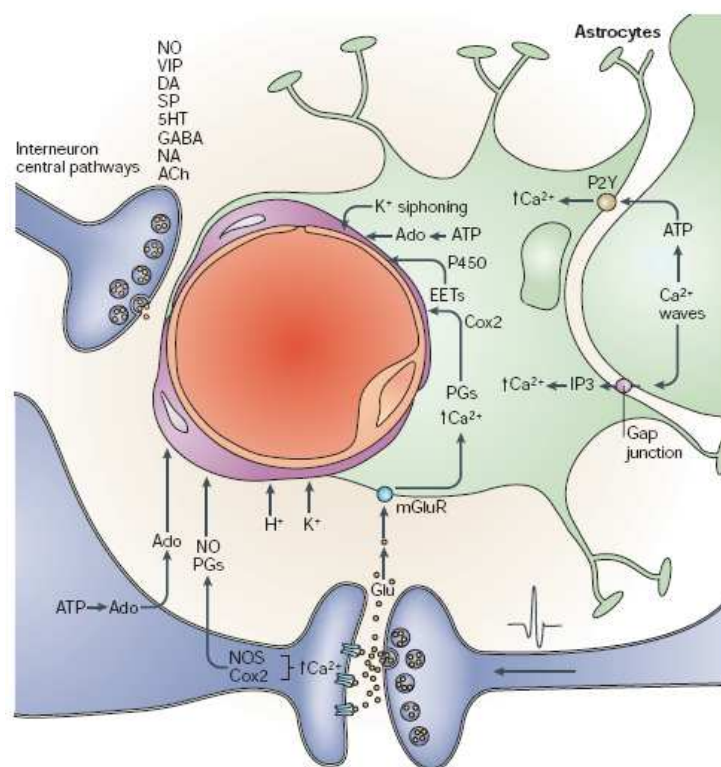


Figure 11 : Les agents vasoactifs libérés par les neurones et les astrocytes lors de l'activité synaptique de (Iadecola 2004).

Le potassium est un des plus importants médiateurs du couplage neurovasculaire. Lors de l'activité neuronale les ions K^+ sont relargués massivement dans l'espace synaptique et sont pris en charge par un effet siphon au niveau des astrocytes *via* un mécanisme de transport incluant des canaux Kir. Les ions K^+ sont ensuite redistribués, dans des sites présentant une faible concentration extracellulaire de potassium, au niveau des pieds astrocytaires qui interagissent avec les artères cérébrales (Butt and Kalsi 2006). Cette augmentation locale du taux d'ions K^+ dans le milieu extracellulaire active le courant Kir2.x des cellules musculaires lisses, induisant

par hyperpolarisation membranaire l'inactivation des canaux calciques voltage dépendant, une diminution du taux de calcium intracellulaire ainsi qu'une vasodilatation de l'artère considérée (figure 12) (Bastide et al. 2007). Les cellules musculaires lisses sont reliées entre elles par des jonctions de types gap qui permettent la propagation des signaux. Cependant, les artères extracérébrales à la surface du cerveau possèdent une grande résistance au flux et sont par conséquent le site principal de régulation du flux sanguin cérébral. La vasodilatation appliquée dans une zone d'activité localisée en aval de ces artères ne peut pas s'effectuer sans une vasodilatation préalable de celles-ci (Iadecola 2004).

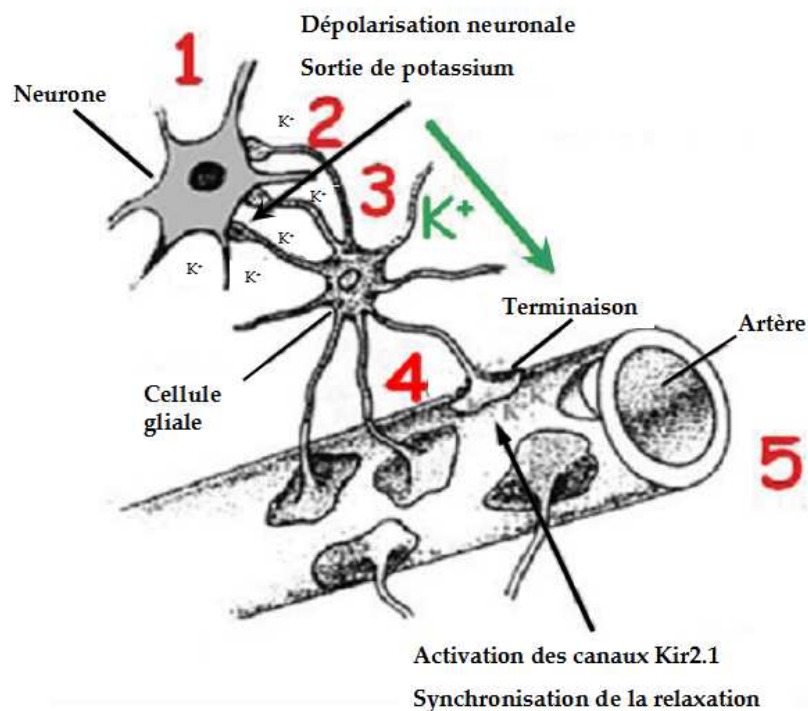


Figure 12 : Mouvement des ions K⁺ au sein de l'unité neurogliovasculaire modifié de (Bastide et al. 2007). L'activité neuronale (1) provoque la sortie des ions K⁺ (2) pris en charge par un effet siphon au niveau des astrocytes (3) puis transmis au niveau des pieds astrocytaires, augmentant ainsi la concentration extracellulaire locale en ions K⁺ (4) déclenchant la relaxation dépendante des canaux Kir2.x (5).

La vasodilatation fait appel à des mécanismes dépendants du calcium impliquant les cellules musculaires lisses ainsi que les péricytes. En effet, les cellules musculaires lisses et les péricytes ont des propriétés contractiles, par l'expression de l'alpha actine (Bandopadhyay et al. 2001, Peppiatt 2006). Ils ont la capacité de convertir le signal chimique provenant des cellules endothéliales, des neurones et des astrocytes en modulant le diamètre des vaisseaux. Ces signaux relaxent ou contractent les péricytes et les cellules musculaires lisses en induisant des changements de concentration du calcium intracellulaire ainsi qu'en altérant l'état de phosphorylation des chaînes légères de myosine (Somlyo et al. 1999).

Cette relation entre les neurones et les vaisseaux sanguins cérébraux s'étendrait également au niveau de la BHE et pourrait expliquer l'implication des neurones dans la mise en place des propriétés de la BHE mais également dans la régulation de sa perméabilité. Une étude *in vivo* a observé une perte d'intégrité de la BHE se traduisant par une désorganisation du complexe jonctionnel suite à l'induction d'une lésion neuronale chez le rat (Kalinin et al. 2006). De plus, il apparaît que la perte de l'intégrité de la BHE accompagne souvent les modifications pathologiques du débit sanguin (Petty and Wettstein 2001). Toutes ces observations impliquent que la communication entre les neurones et l'endothélium cérébral puisse également réguler la perméabilité de la BHE et dont l'influence s'étend sur l'ensemble des microvaisseaux. De plus les neurones seraient capables de moduler la perméabilité de la BHE à certains substrats énergétiques comme le glucose par une augmentation de l'activité du transporteur GLUT-1 pour un apport cérébral plus important en glucose (Leybaert 2005).

IV.2 Les microvaisseaux et les propriétés de la BHE.

L'ensemble des structures physiques et métaboliques de la BHE est induit et maintenu par l'intercommunication au sein de l'UNGV qui inclut également au niveau vasculaire les artérioles et les veinules. L'arbre microvasculaire présente des propriétés spécifiques, réparties de manière hétérogène sur l'ensemble des segments microvasculaires, qui confèrent à chaque segment la fonction qui lui est propre (Ge et al. 2005). Ainsi, les artérioles associées aux cellules musculaires lisses ont pour fonction la régulation du flux sanguin. Les capillaires associés de manière très proche aux cellules perivasculaires et présentant des propriétés restrictives ainsi que des propriétés de défense sont le site d'échanges entre le compartiment sanguin et le compartiment cérébral. Les veinules qui présentent un niveau de restriction de la perméabilité plus faible que celle des capillaires seraient alors le site préférentiel pour la migration leucocytaire (tableau 2).

Caractéristiques	Artériole	Capillaire	Veinule
Association cellulaire			
Cellule musculaire lisse	+	-	+
Péricyte	+	+	+
Macrophage périvasculaire	+	+	+
Association étroite des cellules endothéliales avec les pieds astrocytaires	Non	Oui	Non
Présence d'espace périvasculaire	Oui	Non	Oui
Phénotype de BHE			
Enzyme et pompe d'efflux			
P-gp	ND	+++	ND
Phosphatase alcaline	+++	++	+
Perméabilité			
Perméabilité aux marqueurs d'intégrité de la BHE	ND	Non	Oui
Complexité des jonctions serrées		Réseau complexe et continu formant des jonctions étanches	Structure simple formant des jonctions perméables

Tableau 2 Tableau récapitulatif des associations cellulaires ainsi que des différences de structure entre les segments des microvaisseaux cérébraux (modifié de Ge et al. 2005). Les signes + et - signifient respectivement présence ou absence de la caractéristique. L'intensité de l'expression relative est indiquée par les -, +, ++, +++. ND : Non déterminé.

L'hétérogénéité de structure au sein de la composante vasculaire de l'UNGV explique que les segments présentent une fonction différente, sont capables de répondre différemment au même stimulus.

Bien que l'endothélium vasculaire des capillaires cérébraux représente le site physique, biochimique et métabolique de la barrière séparant le sang du cerveau, les communications au sein de l'UNGV participent à l'induction et au maintien des propriétés de la BHE. On reconnaît alors depuis quelques années que ces interactions participent à la fonction mais également à la dysfonction cérébrale dont la réponse cérébro vasculaire résulte d'interactions complexes au sein de cette unité. En réalité le lien entre la composante vasculaire et neuronale implique d'autres types cellulaires comme les péricytes, les astrocytes ainsi que la microglie au sein de l'UNGV (Hawkins and Davis 2005; Zlokovic 2008).

Chapitre II L'ischémie cérébrale et la neuroprotection

I Les AVC chez l'homme

I.1 Définition, épidémiologie, les facteurs de risques

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la deuxième cause de mortalité et la première cause de handicap dans les pays industrialisés après les maladies coronaires (Donnan et al. 2008). Il apparaît 150 000 nouveaux cas par an en France et dans les pays industrialisés. Ils correspondent à une diminution voire une interruption du flux sanguin cérébral dans un des territoires des artères cérébrales. Dans 20% des cas, l'AVC est d'origine hémorragique et correspond à l'extravasation de sang dans le parenchyme cérébral suite à une dissection artérielle. Dans 80% des cas, l'AVC est d'origine ischémique et correspond à une forte diminution voire un arrêt de la circulation dans une artère cérébrale majeure conséquence de l'occlusion par thrombose ou embolie. L'AVC ischémique peut être transitoire lorsque le flux sanguin est rapidement restauré. Dans le cas contraire, l'AVC est dit constitué et entraîne la formation d'une lésion cérébrale par le déclenchement d'une cascade physiopathologique dont la localisation et l'étendue dépend de l'artère cérébrale touchée ainsi que du délai avant le rétablissement de la circulation. De nombreuses maladies en majorité vasculaires ont été répertoriées comme pouvant être à l'origine de l'AVC ischémique. Les plus fréquemment mises en cause sont l'athérosclérose (évoquée dans 30 % des cas) et les cardiopathies emboligènes (maladies du système cardiaque, conduisant à la libération et à la migration de corps solides dans la circulation sanguine, évoquées dans 20 % des cas).

Les facteurs de risques de l'ischémie cérébrale sont multiples, en effet si l'AVC prend les traits d'une «attaque», il s'agit en réalité de la complication soudaine d'une maladie chronique évoluant depuis plusieurs années. De nombreux facteurs de risque sont à l'origine de cette pathologie, divisés en deux catégories. Les facteurs non modifiables comme l'âge, le sexe et l'hérédité ou alors les facteurs modifiables qui sont liés au mode de vie du patient comme l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le diabète, le syndrome métabolique, la consommation d'alcool, le tabagisme, l'absence d'activité physique (Leys et al. 2002; Lloyd-Jones et al. 2009).

I.2 Les conséquences cérébro-vasculaires de l'ischémie cérébrale

I.2.1 Les conséquences vasculaires : l'œdème cérébral et l'hémorragie cérébrale.

Lors de l'ischémie cérébrale consécutivement à l'occlusion, la déplétion énergétique ne permet plus de maintenir les gradients ioniques transmembranaires, par conséquent l'arrêt des pompes ioniques ATP dépendantes provoque l'augmentation des ions Na^+ intracellulaire qui dépasse de très loin la perte des ions K^+ ce qui induit l'entrée d'eau et d'ions Cl^- dans la cellule. La modification du métabolisme cérébral induit donc dans les premières minutes et heures suivant le début de l'ischémie une diminution du diamètre du capillaire par un gonflement des cellules endothéliales (Simard et al. 2007) (Brillault et al. 2008). Cette première phase correspond à la formation d'un **œdème cytotoxique** lors duquel un mouvement d'eau interstitielle dans le compartiment intracellulaire entraîne le gonflement des cellules endothéliales, des cellules gliales et des neurones. Le gonflement des astrocytes au niveau des pieds astrocytaires est observé rapidement, ils présentent une morphologie hypertrophiée quatre à six heures après le début de l'ischémie qui persiste jusqu'à vingt quatre heures après le début de l'AVC mesuré dans une étude menée *in vivo* chez le rat (Garcia et al. 1994).

L'espace extracellulaire dans le cerveau est relativement petit comparé à l'espace intracellulaire. Il ne représente en effet que 12% à 19% du volume cérébral. Du mouvement d'ions et d'eau à l'intérieur des cellules lors de l'œdème cytotoxique, résulte alors un épuisement du milieu extracellulaire de ses constituants ce qui modifie alors les pressions hydrostatiques et osmotiques du capillaire. Mais bien que ce type d'œdème apparaît de manière précoce, il n'est pas associé à une modification de la perméabilité vasculaire et ne nécessite pas la présence de flux sanguin. En revanche, il crée une **force conductance transcapillaire** favorisant ainsi un appel d'eau dans le parenchyme cérébral pour la formation de l'œdème vasogénique. Cette force de conductance au travers de la BHE représente une source d'énergie potentielle qui ne pourra pas être libérée tant que la perméabilité de BHE reste intacte.

La modification de la perméabilité de la BHE se réalise progressivement au cours d'une ischémie cérébrale lors de laquelle un transport transendothélial des ions est permis et favorisé par une altération précoce de la BHE. Ce premier événement est suivi d'une perte plus prononcée de l'intégrité de l'endothélium capillaire. La perméabilité de la BHE est un critère important dans l'identification de l'œdème puisque Klatzo fut le premier à classer les types d'œdème en fonction de la modification de la perméabilité vasculaire (Klatzo 1967). Contrairement à l'œdème cytotoxique, l'**œdème vasogénique** apparaît plus tardivement et est

directement corrélé avec des lésions plus importantes de la paroi vasculaire. Ainsi, la formation de l'œdème vasogénique dépend du degré de dysfonction de la BHE ainsi que du rétablissement de la pression hydrostatique par reperfusion du lit capillaire (Simard et al. 2007). Lors de l'ischémie reperfusion, la perméabilité vasculaire est modifiée et présenterait un **profil multiphasique** (figure 13). En effet, la dysfonction vasculaire va en partie se traduire par l'augmentation de perméabilité qui apparaît progressivement dès l'occlusion. De plus lors de la reperfusion, une augmentation transitoire de la perméabilité vasculaire, appelée hyperhémie peut être mesurée, lors de laquelle les péricytes et les cellules musculaires lisses pourraient potentiellement aider à l'adaptation de l'élasticité de la paroi vasculaire de par leurs propriétés contractiles mesurées *in vivo* au niveau de la barrière hémato-rétiniène (Peppiatt et al. 2006). Le temps de l'occlusion et le degré de reperfusion sont des paramètres entraînant une dysfonction vasculaire progressive qui influencent la cinétique de modification de la perméabilité vasculaire et dépendent des mécanismes délétères déclenchés.

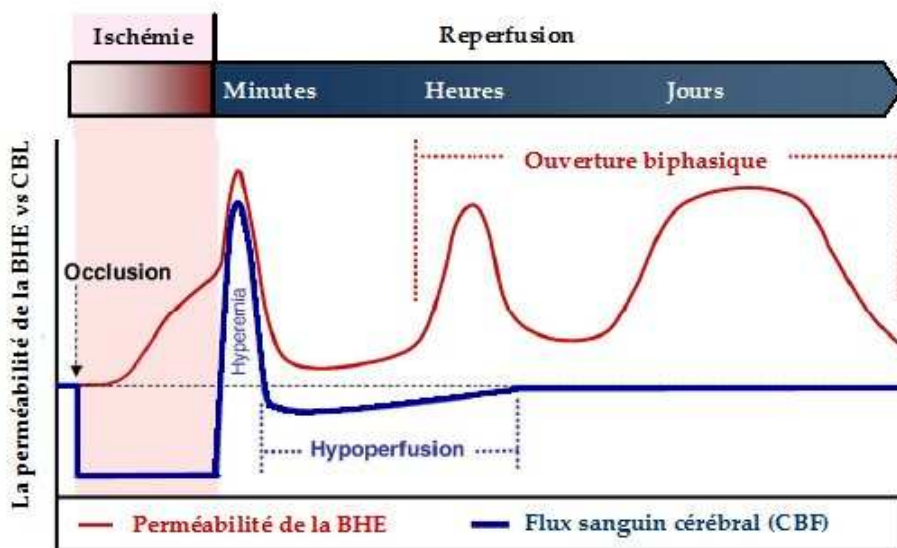


Figure 13: Profil général hypothétique de la cinétique de perméabilité de la BHE en fonction de la modulation du flux sanguin lors de l'ischémie reperfusion selon (Sandoval and Witt 2008)

Dans les cas les plus sévères, la **transformation hémorragique** est un phénomène complexe qui accompagne fréquemment la pathologie de l'ischémie cérébrale, conséquence ultime d'une rupture des capillaires. On estime que plus de 30% à 40% des patients présentant un AVC ischémique subissent une hémorragie cérébrale dont la sévérité et la fréquence augmentent suite à la thérapie thrombolytique (Jaillard et al. 1999). L'hémorragie cérébrale est marquée par une perte d'intégrité des capillaires provoquant la fuite d'éléments sanguins dans le parenchyme cérébral. Elle apparaît spontanément ou lors de la reperfusion. En effet, bien que le

rétablissement de la circulation soit essentiel pour la survie des tissus en souffrance, il contribue à l'aggravation des dommages cérébraux. L'ensemble des mécanismes enclenchés dès l'occlusion puis lors de la reperfusion pourraient favoriser la formation de l'hémorragie post ischémique (Simard et al. 2007).

L'ensemble des mécanismes provoquant les lésions vasculaires contribue à l'extension des lésions parenchymateuses en favorisant la mort neuronale.

I.2.2 Les conséquences au sein du tissu nerveux : construction et évolution de l'infarct

Bien que ne représentant que 2% de la masse totale du corps adulte, le cerveau humain possède des besoins énergétiques considérables. Il est responsable de 20% de la consommation en O₂ à l'état de repos. De plus, le glucose est la source majeure d'énergie pour le cerveau (Simpson et al. 2007) (Qutub and Hunt 2005). En réalité, les cellules cérébrales ne mettent en réserve que très peu de glycogène et ont besoin d'un apport constant en glucose sanguin. Si le flux sanguin cérébral s'arrête, la fonction cérébrale s'arrête dans les quelques secondes et les dommages aux neurones apparaissent dès les premières minutes (Hossmann 1994). La modification de la perfusion cérébrale a rapidement des conséquences délétères sur la fonction cérébrale. Une réduction de 20% du flux sanguin inhibe la synthèse protéique, à 50% on mesure une accumulation de glutamate et de lactate dans l'espace extracellulaire suivis par un mouvement d'eau. Au-delà de 50%, la chute des stocks d'ATP empêche la transmission nerveuse. Si la diminution atteint 80%, les neurones et les cellules gliales perdent leur gradient ionique et se dépolarisent rapidement provoquant la mort cellulaire (Hossmann 2006).

Dans le cas de l'ischémie cérébrale, l'arrêt de la circulation provoque dès lors des lésions cérébrales irréversibles. En effet le défaut de perfusion induit rapidement un épuisement énergétique entraînant la mort des neurones avec un arrêt rapide du couplage neurovasculaire. Alors que dans les conditions physiologiques, le flux sanguin cérébral chez l'adulte est de 54 ml/100g/min, l'ischémie focale induit la formation d'une lésion cérébrale comprenant deux zones. Le **cœur ischémique** où le flux sanguin est diminué à hauteur de 90% à 100%, le sang circule à une vitesse d'une valeur inférieure à 10ml/100g/min. Mais cependant une hypoperfusion persiste dans une zone qui entoure le cœur ischémique, appelée **zone de pénombre**, le flux sanguin y est diminué à hauteur de 50% à 75%, il circule alors à une vitesse de 25 à 40 ml/100g/min.

Ces deux zones se distinguent par des processus physiopathologiques qui se manifestent à des phases différentes dans la progression de la lésion. En effet, alors que l'attaque débute lors de

l'hypoperfusion focale, les processus pathologiques se manifestent dans les minutes, les heures et les jours suivant le début de l'ischémie. Dans le cœur ischémique qui est la zone la plus sévèrement touchée par l'interruption du flux sanguin, les dommages cérébraux sont rapides et irrémédiables, les neurones meurent de nécrose dans les minutes suivant le début de l'attaque cérébrale. La zone de pénombre quant à elle, correspond à une aire dans laquelle le faible flux sanguin résiduel temporise les effets délétères de l'AVC. Le tissu cérébral est fonctionnellement atteint, inactif sur le plan de l'activité neuronale mais encore viable. La pénombre ischémique est en réalité un concept qui énonce que lors du processus ischémique, il y a une expansion progressive de la zone irrémédiablement lésée vers une zone périphérique appelée pénombre. En effet, la lésion se propage rapidement par une onde de dépolarisation, qui correspond à une onde de propagation qui s'étend progressivement du cœur ischémique à la zone de pénombre (Hossmann 1994) (Hossmann 1996). La dépolarisation membranaire apparaît irréversible dans le cœur ischémique. Cependant, l'hypoperfusion résiduelle permet aux cellules de la zone de pénombre de se repolariser au détriment d'une consommation d'énergie plus importante. Dans cette zone, les cellules peuvent subir des dépolarisations répétitives qui semblent pouvoir se répéter plusieurs fois par heure et ce de manière prolongée, que l'on appelle dépolarisation péri-infarctus (Dirnagl et al. 1999). Ce phénomène, délétère pour les cellules, a pour conséquence l'augmentation de l'étendue du cœur ischémique (figure 14).

Ainsi, la pénombre est un concept dynamique dans le temps et dans l'espace qui est reconnu du point de vue expérimental mais il n'est pas encore accepté en clinique.

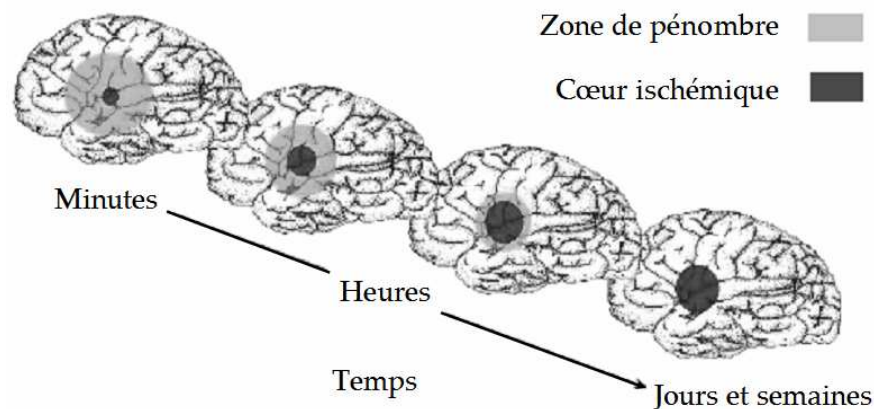


Figure 14 : Gradation des événements cellulaires dans le temps (Dirnagl et al. 1999).

Dans la zone de pénombre, les neurones peuvent être secourus si une intervention thérapeutique par thrombolyse intervient dans les quatre heures trente après le début de l'attaque (Paciaroni et al. 2009). Dans la zone de pénombre, la mort cellulaire apparaît plus tardivement *via* des mécanismes d'inflammation et d'apoptose (Gonzalez 2006). La sévérité de

l'AVC et le temps d'attente avant la reperfusion déterminent le devenir de chaque cellule nerveuse dans cette zone.

I.3 La cascade des mécanismes cellulaires lésionnels

L'arrêt de la perfusion provoque la mise en place de mécanismes pathologiques entraînant la progression des dommages cérébraux à l'ensemble des cellules de l'UNGV. Ces mécanismes suivent une progression spatiale et temporelle du cœur ischémique et s'étendent dans la zone de pénombre (Figure 15).

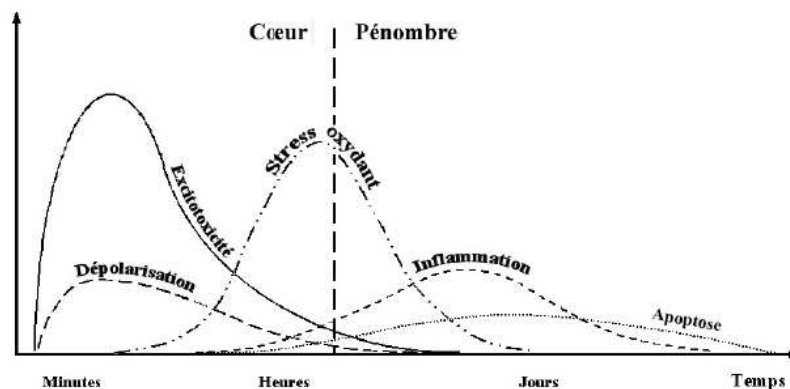


Figure 15 : Diagramme simplifié de la cascade ischémique d'après (Dirnagl et al. 1999).

I.3.1 Les mécanismes conduisant à la mort neuronale

I.3.1.1 Les premiers effets de l'épuisement en énergie et l'excitotoxicité

Le métabolisme cérébral nécessite une quantité importante d'oxygène et de glucose pour la synthèse d'une quantité suffisante d'ATP par phosphorylation oxydative afin de maintenir et de restaurer les gradients ioniques. La première conséquence de l'occlusion est une perturbation de l'état énergétique de la cellule. Le stock d'ATP est consommé dans les deux premières minutes suivant l'occlusion. Cela a pour conséquence l'arrêt des pompes ioniques ATP dépendant et principalement la Na^+/K^+ ATPase induisant ainsi la modification des potentiels membranaires. Cela provoque une augmentation de la concentration extracellulaire en ions K^+ et un influx des ions Na^+ , Cl^- et Ca^{2+} dans le compartiment intracellulaire. L'augmentation initiale des ions K^+ déclenche la dépolarisation des neurones et des cellules gliales. Dans ces conditions, l'activation des canaux calciques enclenche de nombreux processus délétères. En effet, le calcium est un important second messenger. Il peut activer des phénomènes rapides comme l'activation d'enzymes, des lipases, des protéases ainsi que des DNases induisant des mécanisme de mort cellulaire (Doyle et al. 2008). L'augmentation du taux de

calcium provoque également la libération massive de glutamate dans l'espace périvasculaire (Rossi et al. 2007). Ceci a pour conséquence d'activer les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid) perméables au calcium. L'ouverture de ces canaux participe à maintenir la dépolarisation membranaire et ainsi exacerber l'entrée de calcium intracellulaire (Doyle et al. 2008) (figure 16). Cette phase appelée excitotoxicité se concentre initialement dans le cœur ischémique et provoque la mort rapide des neurones et des cellules gliales par nécrose.

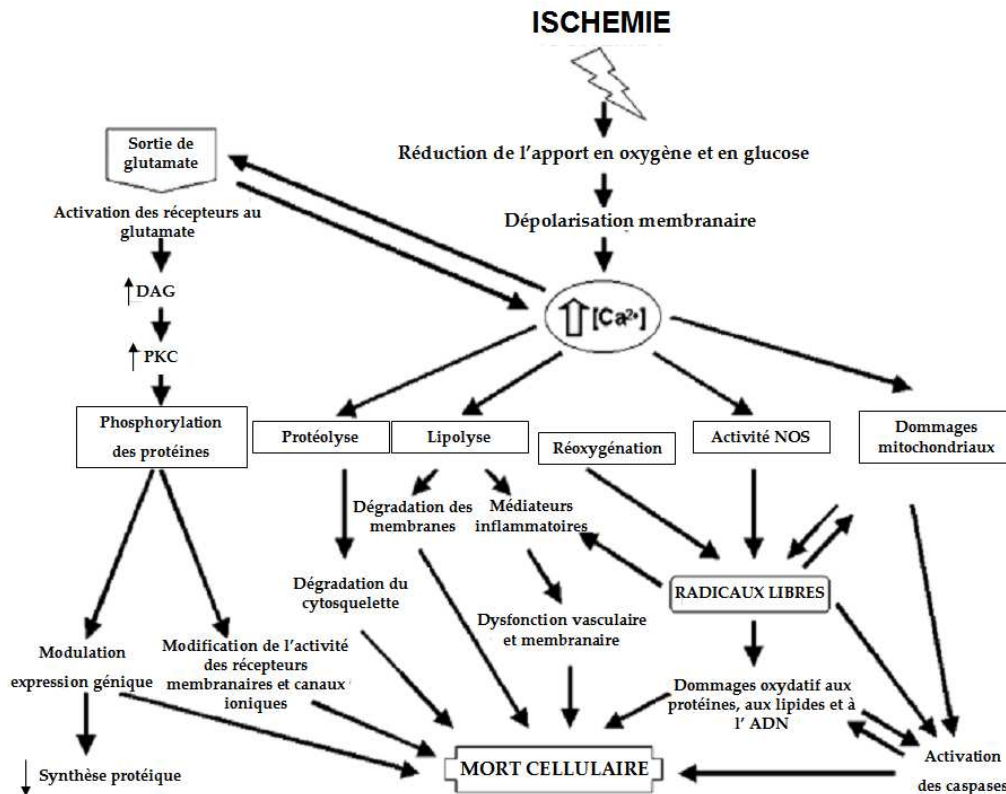


Figure 16 : Cascade physiopathologique menant à la mort neuronale d'après (Crack and Taylor 2005).

Le calcium peut également engendrer des mécanismes plus lents comme la régulation de cascades de signalisation ainsi que l'expression de facteurs de transcription (Brown and Davis 2002; Seta et al. 2004). Il est capable d'activer la production de ROS (reactive oxygen species), d'enzymes protéolytiques et induit la cascade de l'acide arachidonique pour une dégradation des lipides membranaires. Le calcium joue ainsi un rôle central dans le déclenchement des mécanismes délétères.

I.3.1.2 Le stress oxydant

Dans les conditions physiologiques, les ROS sont produites en faible quantité et jouent un rôle important dans la signalisation et le métabolisme. De plus, les capillaires cérébraux, riches en

xanthine oxydase sont une source majeure de ROS (Betz 1985) qui sont rapidement métabolisées. Le faible taux de ROS est maintenu par le système enzymatique de protection endogène *via* la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GSHPx) et la catalase. D'autres petites molécules comme le glutathion et l'acide ascorbique sont également impliquées dans la détoxification des radicaux libres.

Lors de l'ischémie cérébrale, les hautes concentrations intracellulaires en calcium et en sodium induisent la production par les mitochondries de quantités délétères de ROS. Cette production est exacerbée lors de la reperfusion (Gursoy-Ozdemir et al. 2004). Le stress oxydant apparaît lorsque le système de protection endogène est alors insuffisant face à cette libération massive de ROS. Les principales ROS sont l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyl (OH^-), le NO (nitric oxide) qui réagit avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour donner du peroxynitrite ($ONOO^-$). Les enzymes pro-oxydantes sont classées selon la nature de la molécule oxydante qu'elles produisent. La NO synthase (NOS) utilise l'arginine et le dioxygène pour produire le NO. Les superoxydes sont générés par de nombreux systèmes enzymatiques, les cyclooxygénases 1 et 2 (COX-1 ; COX-2), la xanthine dehydrogénase, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxidase), tandis que la myeloperoxydase et la monoamine oxydase génèrent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Chan 2001). Les ROS présentent un spectre d'action large. Elles ont une action directe sur l'intégrité cellulaire par peroxydation et la dégradation des lipides membranaires (figure 17) (par l'action de la lipoxygénase sur les phospholipides induisant le relargage de l'acide arachidonique), des protéines (par l'action du peroxynitrite induisant la nitrotyrosination des protéines), des acides nucléiques (par le clivage des acides nucléiques durant l'hydroxylation de la guanine et la méthylation de la cytosine) (Chan 2001; Nakka et al. 2008).

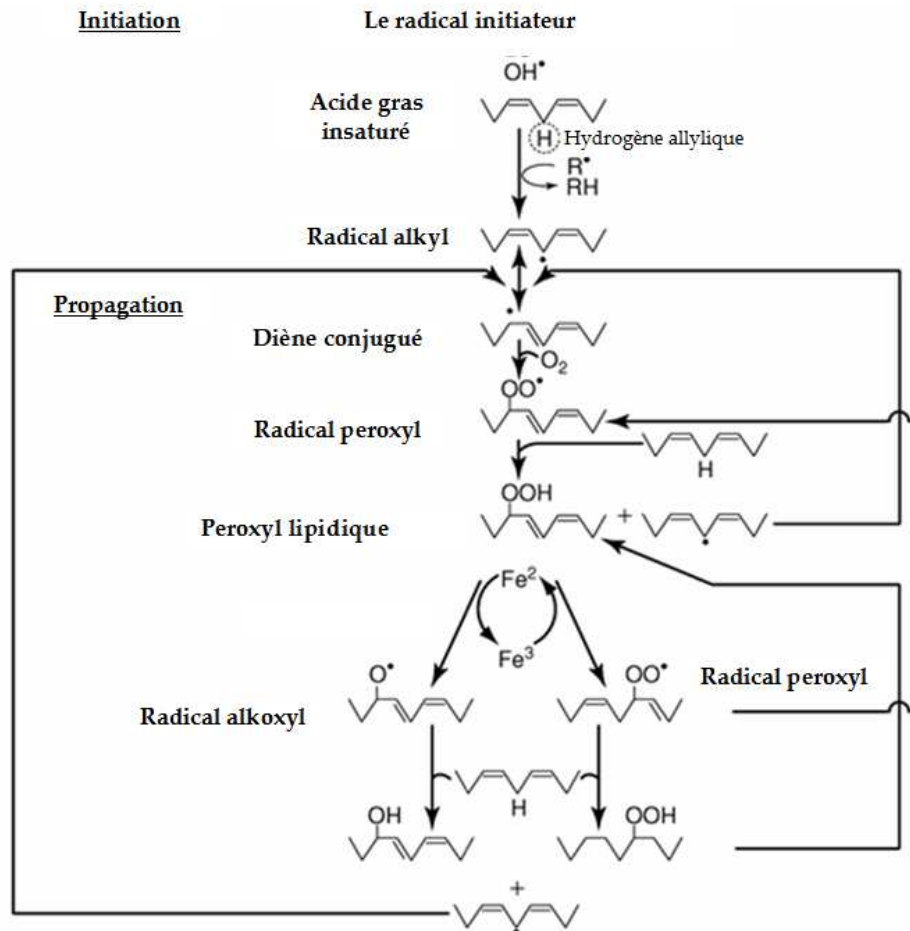


Figure 17 : Initiation et propagation de la peroxydation des lipides membranaires (modifié de Hall and Bosken 2009). Les formes radicalaires initient la réaction en arrachant un hydrogène d'un groupe méthyl (CH₂) en α d'une double liaison d'un acide gras polyinsaturé. Le réarrangement moléculaire conduit à un diène conjugué qui réagit avec O₂ pour former un radical peroxy très réactif. Le peroxy lipidique réagit avec le fer pour former un radical alkoxy et peroxy. L'entretien de la réaction s'effectue par les espèces radicalaires formées qui arrachent à leur tour un hydrogène.

Elles peuvent agir indirectement en interrompant la signalisation cellulaire et l'expression des gènes. De plus, les ROS ciblent également la mitochondrie, elles bloquent la respiration mitochondriale en inhibant le complexe enzymatique impliqué dans la chaîne de transport des électrons (Yamamoto et al. 2002). Le déséquilibre oxydatif est délétère pour la BHE. Il a d'ailleurs été démontré que les ROS sont capables d'induire *in vitro* une augmentation de la perméabilité de cellules endothéliales de capillaires cérébraux de rat (Lagrange et al. 1999) et ainsi favoriser la formation de l'œdème (Chan et al. 1984; Heo et al. 2005). Les ROS proviennent principalement des cellules microgliales. Quatre à six heures après le début de l'ischémie, les cellules microgliales rétractent leurs prolongements cytoplasmiques et adoptent une morphologie améboïde, caractéristique de la microglie activée (Giulian 1997). Celles-ci produisent alors des neurotoxines, incluant le NO, le TNF-alpha ainsi que l'anion superoxyde par l'activation de la NADPH oxydase. Le stress oxydant module également la perméabilité

vasculaire, la mort cellulaire, l'inflammation ainsi que l'activation d'enzymes protéolytiques (Crack and Taylor 2005).

Le NO est un important médiateur lors du stress oxydant. Il est produit à partir de la L-arginine par une enzyme, la Nitric oxide synthase (NOS) présente dans plusieurs types cellulaires au sein de l'UNGV. Cette enzyme existe sous plusieurs isoformes différentes, la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS) qui sont toutes deux dépendantes du calcium, et la NOS inducible (iNOS) indépendante du calcium est activée par des cytokines (Zhang et al. 1995). La nNOS et la eNOS sont des isoformes constitutives qui produisent dans les conditions physiologiques des quantités faibles de NO (dans des concentrations de l'ordre du nanomolaire) alors que dans des conditions pathologiques l'activation simultanée de la nNOS ainsi que de la iNOS est responsable de la production de quantités importantes de NO (dans des concentrations de l'ordre du micromolaire au millimolaire). Le NO produit par ces deux isoformes présente des effets délétères qui sont fortement liés à la formation de peroxy-nitrite mais également par l'activation d'enzymes protéolytiques et de facteurs de transcription (NF- κ B et Activated protein-1 (AP-1)). La synthèse du NO lors de l'ischémie cérébrale est initiée lors de la phase précoce par le glutamate par l'activation de la nNOS (Lin et al. 1996; Mayhan and Didion 1996) mais également plus tardivement lors de la reperfusion par l'activation de la iNOS par les cytokines au niveau des cellules gliales et des neutrophiles (Zhang et al. 1995) (Iadecola 1997). Cependant, le NO produit par la eNOS démontre des effets protecteurs. Il a un effet vasodilatateur, il inhibe l'agrégation plaquettaire et l'adhésion leucocytaire lors de l'inflammation (Iadecola 1997) (Endres et al. 2004)

I.3.1.3 L'apoptose:

Traditionnellement, la mort cellulaire consécutive à l'ischémie cérébrale est considérée comme étant exclusivement de la nécrose. En effet, la nécrose est prédominante et intervient très rapidement dans le cœur ischémique au niveau des neurones et des cellules gliales. Cependant, l'apoptose est le mécanisme de la mort cellulaire dans la zone de pénombre des cellules gliales et neuronales par l'activation de voies intrinsèques et extrinsèques (Mattson et al. 2000). L'induction de l'apoptose fait intervenir plusieurs mécanismes de la cascade physiopathologique, l'épuisement énergétique, l'excitotoxicité (Zhang and Bhavnani 2006), le stress oxydant (Liu 2003), l'activation de protéases.

La voie intrinsèque d'activation de l'apoptose est médiée par le calcium et le stress oxydant. L'augmentation du taux de calcium active les protéines Bid, Bad et Bax qui forment un pore de perméabilité membranaire mitochondriale pour le relargage du cytochrome c et du facteur AIF (apoptosis inducing factor). Le cytochrome c forme avec Apaf-1 (apoptotic protein-activating factor-1) et la procaspase-9 un complexe appelé apoptosome qui active la caspase-9 initiateur ainsi que la caspase-3 effectrice. Le clivage d'une enzyme de réparation de l'ADN, PARP (poly (ADP ribose) polymérase) entraîne des dommages à l'ADN. Le stress oxydant par la formation d'anion superoxyde et le facteur AIF induisent l'apoptose par un mécanisme indépendant des caspases (figure 18).

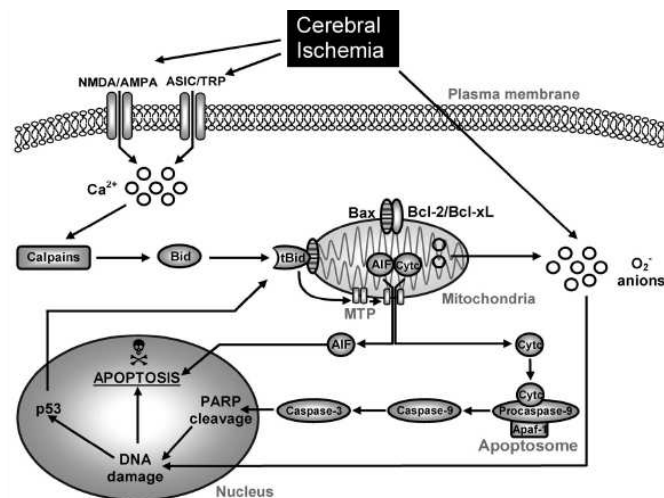


Figure 18 : La voie d'activation intrinsèque de l'apoptose. (D'après Broughton 2009).

La voie extrinsèque est médiée par l'activation des membres pro-apoptotiques de la superfamille des récepteurs TNF/Fas qui activent la caspase-8 initiateur qui va à son tour activer la caspase-3 effectrice. Ces récepteurs sont activés par la réponse inflammatoire consécutive à l'ischémie (del Zoppo 1997; del Zoppo and Hallenbeck 2000) (figure 19).

L'activation de l'apoptose résulte d'un équilibre entre les facteurs pro-apoptotiques (Bcl-x_s, Bax, Bad, Bid, Bak...) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L, Bag-1...) de la famille Bcl-2. Une diminution de l'expression des protéines antiapoptotiques Bcl-2 et de Bcl-x_L a été mesurée dans les premières heures de l'ischémie cérébrale (Webster et al. 2006).

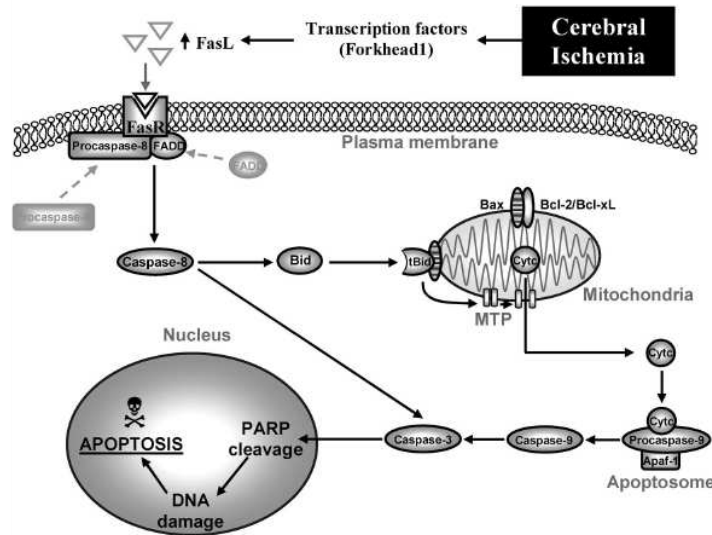


Figure 19 : La voie d'activation extrinsèque de l'apoptose (d'après Broughton 2009).

Bien que ces mécanismes soient majoritairement décrits au niveau neuronal, l'apoptose est également un mécanisme de mort pour les cellules gliales et des cellules endothéliales. En effet, l'apoptose a été identifiée dans des cellules gliales suite à l'ischémie reperfusion associée à une augmentation de la caspase-3 dans les astrocytes et les cellules microgliales (Krupinski et al. 2000; Love 2003). Au niveau de l'endothélium l'apoptose est principalement induite par le stress oxydant et en particulier par la formation du peroxy-nitrite hautement toxique (Kontos 2001; Rodriguez-Yanez et al. 2006) ainsi que par le TNF- α et les ROS qui activent la voie extrinsèque *via* les récepteurs TNF/Fas.

Bien que la mort neuronale soit à l'origine des déficits neurologiques, l'ischémie cérébrale est avant tout une pathologie vasculaire dont les dommages contribuent à l'extension de la mort neuronale ainsi qu'à la diminution du pronostic vital des patients (Ayata and Ropper 2002).

I.3.2 Les mécanismes menant à l'augmentation de la perméabilité vasculaire

La dysfonction vasculaire consécutive à l'ischémie et à la reperfusion résulte d'une altération progressive de la perméabilité de la BHE menant à la formation de l'œdème vasogénique et à la transformation hémorragique.

I.3.2.1 Les effets précoces sur la paroi vasculaire : la dysfonction de la BHE.

L'ischémie cérébrale provoque une altération rapide de la BHE. Lors de la phase aiguë de l'ischémie, les modulations des gradients ioniques ainsi que les modulations métaboliques et

hémodynamiques induisent une altération rapide de la fonction endothéliale. En effet, après quelques heures déjà, la fuite capillaire peut être observée tant dans les conditions expérimentales que cliniques. Il existe évidemment un délai entre les premiers signes de rupture de la BHE et la constitution de l'œdème vasogénique. On observe progressivement une altération de la fonction restrictive de la BHE mesurée de manière précoce à l'aide de modèles *in vitro*. La modélisation *in vitro* de l'ischémie cérébrale permet d'étudier la phase précoce enclenchée dès l'occlusion. Ces études montrent une augmentation de la perméabilité transcellulaire de la BHE dépendant de facteurs solubles sécrétés par les cellules gliales. Cette augmentation précoce apparaît sans rupture visible des jonctions serrées (Brillault et al. 2002; Culot et al. 2009). Cette première phase de dysfonction de l'endothélium pourrait être causée par l'effet des substances relarguées massivement lors de cette phase précoce. L'effet du glutamate a été étudié *in vitro* sur une culture primaire de cellules endothéliales issues de microvaisseaux cérébraux de rat pour laquelle une incubation avec du glutamate induisait une augmentation de la perméabilité (Andras et al. 2007). Un effet a également été mesuré *in vivo* chez le rat et impliquerait un mécanisme dépendant du NO (Mayhan and Didion 1996). De plus de nombreuses substances peuvent également provoquer une augmentation de la perméabilité comme le VEGF (vascular endothelial growth factor), l'ET-1 (l'endothelin) ainsi que des cytokines dont la production augmente de manière importante lors de la reperfusion.

La progression de la dysfonction endothéliale met en jeu l'intégrité de la BHE. En effet, la modulation de la perméabilité de la BHE impliquerait une altération de la matrice extracellulaire par la diminution de l'expression des intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ au niveau de l'endothélium et de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ des astrocytes qui coïncide alors avec une altération structurale des microvaisseaux par une perte de contact entre ces deux types cellulaires qui contribue à une déstabilisation des jonctions serrées (Tagaya et al. 2001; Del Zoppo et al. 2006). De récentes études suggèrent que l'intégrité de la BHE ne repose qu'en partie sur les jonctions serrées. Une augmentation de la perméabilité vasculaire a été mesurée suite à la perte de contact entre les cellules endothéliales et les cellules gliales (Willis et al. 2004).

De plus, on peut également mesurer une modification des jonctions serrées suite à l'augmentation du taux de calcium intracellulaire qui est impliqué dans de nombreux processus de signalisation. En effet, le calcium est capable de réguler la perméabilité vasculaire par la modulation des jonctions serrées en activant le système calcium/calmodulin et la protéine kinase C (PKC) provoquant la phosphorylation de MLC (myosin like chain) par la MLCK (myosin like chain kinase). Ceci induit une modulation du cytosquelette d'actine et un

réarrangement des jonctions serrées observés avec une augmentation de la perméabilité vasculaire (Abbruscato and Davis 1999) (Brown and Davis 2002) (Witt et al. 2003) (Brown and Davis 2005). Le rôle de la PKC et du calcium a été suggéré dans la modulation des jonctions adhérentes, *via* la VE-cadhérine observé avec une augmentation la perméabilité de cellules endothéliales issues de la veine ombilicale humaine (Sandoval et al. 2001).

De l'ensemble des mécanismes mis en place, résulte une augmentation exacerbée de la perméabilité de la BHE ainsi qu'une déstabilisation de la BHE pouvant impliquer une perte progressive du contact avec les pieds astrocytaires mais également une modulation des jonctions serrées.

I.3.2.2 La dégradation de la membrane basale

Lors de la réoxygénation, le stress oxydant par la production de ROS est capable de modifier l'intégrité vasculaire en induisant l'activation d'enzymes protéolytiques, les métalloprotéinases (MMP) qui dégradent la lame basale. Ces enzymes sont sécrétées par les péricytes, *via* la sécrétion de l'angiopoietine-2 (Zozulya et al. 2008), les astrocytes, les cellules endothéliales et la microglie comme zymogènes et sont scindées sous leur forme active au niveau extracellulaire par interruption de l'interaction zinc-thiol entre le site catalytique et le prodomaine des MMP (Gasche et al. 2006). Ces enzymes sont des Ca^{2+} ou Zn^{2+} endopeptidases capables de dégrader les protéines de la matrice extra-cellulaire, elles sont capables de dégrader la fibronectine, la laminine, les protéoglycanes et le collagène de type IV. Parmi elles, la MMP-2 (Gelatinase A) et la MMP-9 (gélatinase B), ont montré *in vivo* chez le rat une augmentation de leur activité suite à l'ischémie-reperfusion (Lu et al. 2008), qui semble être médiée par la formation exacerbée des ROS (Jian Liu and Rosenberg 2005). Les MMP présenteraient un profil multiphasique d'augmentation de leur activité. Il apparaît que lors d'une première phase d'augmentation de son activité, la MMP-9 proviendrait des cellules de l'UNGV activées par le stress oxydant. De plus, le NO peut également activer la MMP-9 par une S-nitrosylation au niveau de son site catalytique (Gu et al. 2002). Lors d'une seconde phase plus tardive, la sécrétion de MMP-9 proviendrait des polynucléaires neutrophiles (PNN) activés par l'inflammation (Rosell and Lo 2008) ce qui pourrait favoriser leur transmigration entre les cellules endothéliales (Rosell et al. 2008). D'autres MMP participeraient également à l'extension des lésions. La MMP-2 serait présente de façon constitutive avec un niveau d'expression élevé, cependant une augmentation de son activité serait mesurée dans les temps précoces. La MMP-3 est inductible comme la MMP-9 et jouerait un rôle dans la modulation de l'inflammation (pour revue (Candelario-Jalil et

al. 2009). Cependant bien qu'une augmentation de l'activité des MMP soit retrouvée dans de nombreux cas lors d'augmentation de perméabilité vasculaire, l'implication des MMP reste encore indéterminée ainsi que les mécanismes qui demeurent à ce jour inconnus.

La sévérité de l'ischémie, le degré de reperfusion, la dégradation de la matrice lors de l'ischémie reperfusion, sont des paramètres qui semblent influencer le profil de perméabilité vasculaire.

I.3.2.3 L'inflammation et la rupture de la BHE

L'inflammation est un processus pathologique plus tardif activé par l'hypoxie, la production de ROS et l'augmentation du calcium intracellulaire, qui contribue à l'extension des lésions ischémiques. L'inflammation met en jeu l'activation de l'ensemble des cellules de l'UNGV ainsi que le recrutement de cellules sanguines et présente des conséquences au niveau de l'intégrité vasculaire. Cette activation met en jeu également l'expression de nombreux facteurs de transcription (NF- κ B, HIF-1, STAT-3) et ainsi de gènes pour la synthèse et le relargage de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , TGF- β , IL-1 β , IL-6) par les astrocytes, la microglie et les neurones (Didier et al. 2003) (Hanisch and Kettenmann 2007) (Backstrom et al. 1996) (Barone and Feuerstein 1999). L'inflammation serait un processus prépondérant lors de l'ischémie cérébrale puisque des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires ont été retrouvés dans le liquide cébrospinal de patients (Feuerstein et al. 1994) ainsi que dans le cerveau d'animaux ischémiés (Tarkowski et al. 1997). L'action des cytokines ciblerait plusieurs types cellulaires. En effet, la production de cytokines induit l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium et d'intégrines (L-selectine et l'intégrine- β 2) à la surface des PNN (del Zoppo et al. 2000). Ces molécules d'adhésion sont impliquées dans les étapes d'interaction puis de transmigration des PNN au travers des cellules endothéliales (figure 20).

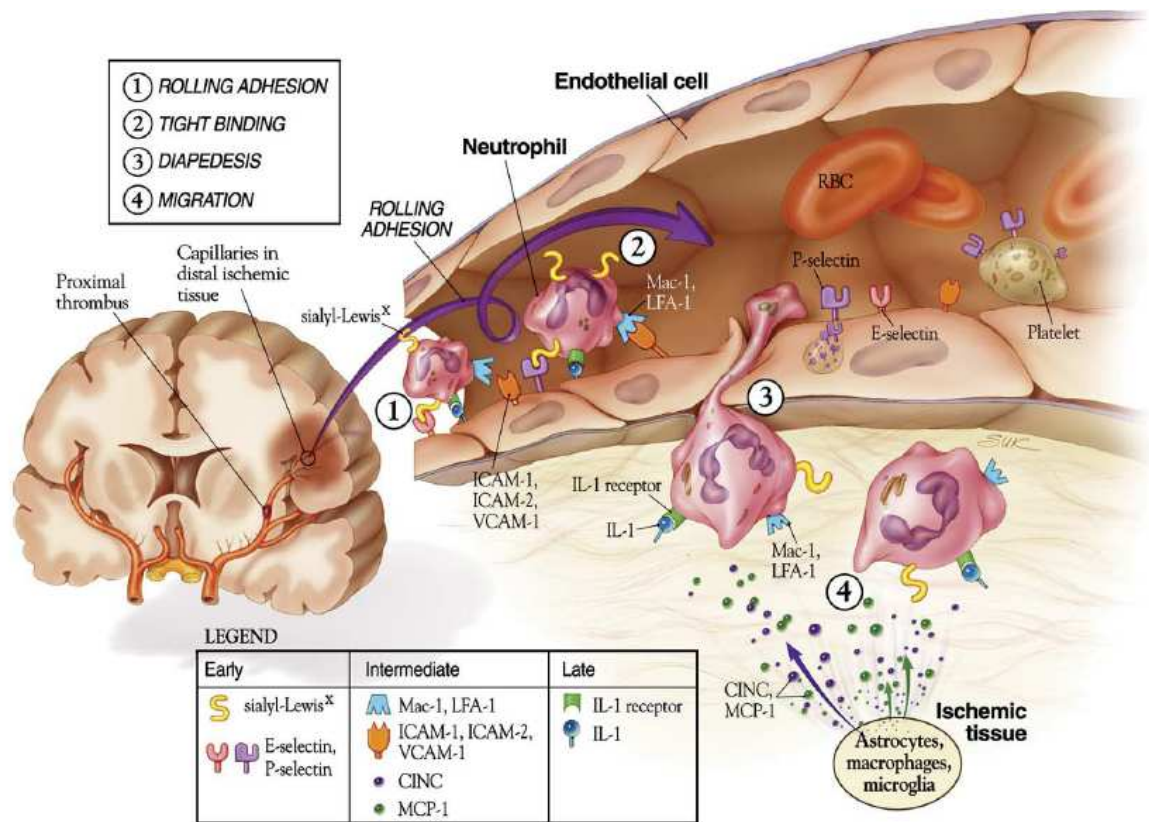


Figure 20 : La cascade inflammatoire au sein des cellules endothéliales lors de l'ischémie cérébrale (Huang et al. 2006).

Les polynucléaires neutrophiles interagissent *via* leur motif Sialyl Lewis^x avec les sélectines (1) avant la fixation sur les immunoglobulines ICAM-1, VCAM-1 et VCAM-2 grâce aux intégrines Mac-1 et LFA à la surface des PNN (2). Les astrocytes, les macrophages et les cellules microgliales sécrètent des facteurs chemoattractants pour la diapédèse des neutrophiles (3) qui une fois dans le parenchyme cérébral participent à la destruction des tissus par le relargage de radicaux libres et la synthèse d'enzymes protéolytiques (4).

Les sélectines (E-selectine, P-selectine) stockées dans les corps de Weibel Palades (des vésicules de stockages spécifiques de l'endothélium) sont les premières molécules d'adhésion retrouvées à la surface des cellules endothéliales au niveau des veinules post-capillaires. Elles seraient capables d'interagir avec le motif tétrasaccharidique Sialyl LewisX (acide neuraminique α 2-3 galactose β 1-4 N-acétyl glucosamine α 1-3 fucose) présent à la surface des PNN circulants ce qui semble faciliter le roulement des leucocytes (Okada et al. 1994). Les immunoglobulines ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), ICAM-2 (intercellular adhesion molecule-1) et VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) permettraient une adhésion plus forte avec l'endothélium. Les cytokines induisent également la synthèse de chemokines MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) et CINC (cytokine induced neutrophil chemoattractant) par les astrocytes, les cellules microgliales pour le recrutement des PNN activés qui représentent les types cellulaires prédominants entre les cinquième et septième jours après l'AVC. Bien que les mécanismes de rupture de la BHE dans les temps tardifs de la reperfusion ne soient pas

identifiés, la transmigration leucocytaire pourrait participer aux dommages vasculaires. Cela passerait par l'augmentation du taux de MMP-9 pouvant être sécrétée par les PNN afin de dégrader la membrane basale ce qui faciliterait le passage paracellulaire (Justicia et al. 2003; Rosell et al. 2008; Rosell and Lo 2008). De plus, une fois dans le tissu cérébral, les PNN participeraient à l'extension des lésions impliquant la sécrétion de ROS ou encore d'enzymes protéolytiques (Justicia et al. 2003). L'ensemble de ces facteurs sécrétés participe à la modulation de la perméabilité vasculaire et certaines chemokines comme MCP-1 a montré un profil d'expression biphasique corrélé avec des phases d'augmentation de la perméabilité endothéliale dans un modèle de BHE *in vitro* suite à l'OGD-réoxygénation (Dimitrijevic et al. 2006). Les mécanismes de modulation de la perméabilité vasculaire feraient intervenir des modifications structurales au niveau des jonctions serrées *via* les cytokines comme le TNF- α . En effet, JAM-A a été identifié comme un médiateur de la transmigration leucocytaire, en présentant un profil de redistribution autour du site de pénétration des PNN (Weber et al. 2007) qui serait induit par le TNF- α (Ostermann et al. 2002).

Ainsi l'augmentation de la perméabilité de la BHE est un processus progressif induit dès le début de l'ischémie cérébrale lors de l'occlusion par une dysfonction de la BHE qui se traduit progressivement par une perte de l'intégrité vasculaire. La progression de la dysfonction vasculaire résulte de l'intégration des processus physiopathologiques déclenchés par l'activation de l'ensemble des cellules au sein de l'UNGV. Cependant parallèlement à cela des mécanismes de réparation sont mis en place.

I.3.2.4 L'angiogenèse

Parallèlement au mécanisme de mort, les mécanismes de réparation initient la formation de nouveaux vaisseaux. En effet, malgré le rôle délétère que peut représenter la protéolyse de la matrice, les MMP et notamment la MMP-9 peuvent également jouer un rôle bénéfique au cours de l'ischémie cérébrale puisqu'elles sont décrites comme des acteurs centraux du **remodelage vasculaire** et **neuronal** qui fait suite à une ischémie-reperfusion (Zhao et al. 2006a) (Rosell and Lo 2008). En effet, l'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux existants notamment dans la zone de pénombre et fait partie de la réponse du tissu cérébro-vasculaire aux dommages ischémiques. Les remaniements de la matrice, la génération de protéases ainsi que les signaux inflammatoires sont nécessaires à l'initiation de

l'angiogénèse. Lors de ce processus les MMP sont assistées par les facteurs de croissance comme notamment le VEGF ainsi que les angiopoïétines (Beck and Plate 2009). Les angiopoïétines 1 et 2 (Ang-1 et Ang-2) sont impliquées dans la maturation et la stabilisation des néo-vaisseaux (Yancopoulos et al. 2000). Ang-2 se comporte comme un antagoniste de Ang-1 (Davis et al. 1996). L'Ang-1 serait exprimée constitutivement par les cellules cérébrales et participerait à la stabilisation de la BHE (Zhang et al. 2002). Au cours de la phase aiguë de l'ischémie, l'expression de l'Ang-1 diminue alors que celles du VEGF et de l'Ang-2 augmentent ce qui participe à la déstabilisation de la BHE. A l'inverse une augmentation importante de l'expression de Ang-1 a été observée à partir de 2 à 3 jours après le début de l'ischémie cérébrale focale. Cette augmentation coïnciderait avec la diminution progressive de l'hyperperméabilité de la BHE (Beck et al. 2000). Les facteurs angiogéniques Ang-1/Ang-2 et VEGF semblent donc impliqués dans le contrôle de la perméabilité de la BHE au cours du remodelage vasculaire.

I.4 Les modèles d'étude de la perméabilité vasculaire lors de l'ischémie cérébrale.

La pathologie de l'ischémie cérébrale est une pathologie complexe qui implique l'intercommunication au sein de l'UNGV. L'identification du rôle de chaque entité au sein de cette unité devient alors essentielle pour la compréhension des mécanismes mis en place lors de la dysfonction vasculaire. La physiopathologie de l'ischémie cérébrale est étudiée grâce aux modèles *in vivo* qui sont développés afin de mimer la situation clinique de la pathologie. Cependant, identifier précisément les mécanismes cellulaires et moléculaires requière l'utilisation de modèles *in vitro*.

I.4.1 Etudes *in vivo*

L'identification de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale ainsi que le développement de traitements protecteurs nécessite l'utilisation de modèles animaux. Bien qu'il n'existe pas un modèle idéal d'étude, un modèle *in vivo* se doit de répondre à un certain nombre de critères afin de se rapprocher des conditions cliniques. En effet, le modèle animal doit être en adéquation avec la situation clinique en induisant les processus ischémiques ainsi que les réponses physiopathologiques mesurés chez l'homme. De plus, la technique utilisée doit être simple, reproductible et la moins invasive avec un contrôle des paramètres physiologiques de l'animal. Enfin, le prélèvement du cerveau doit être aisément réalisable afin que des mesures histologiques, biochimiques et de biologie moléculaire puissent être effectuées (Durukan and Tatlisumak 2007). Il existe plusieurs modèles mais la plupart d'entre eux sont développés pour induire une lésion dans le territoire de l'artère cérébrale moyenne dans le but d'être le plus approprié à l'étude des AVC chez l'homme (del Zoppo et al. 1992). Parmi les modèles les moins invasifs, il existe le **modèle thromboembolique** qui consiste en l'injection d'un caillot au niveau de l'artère cérébrale moyenne. Il est adapté à l'étude des agents thrombolytiques (Overgaard 1994), des conséquences de la thrombolyse (Brinker et al. 1999) ainsi que des thérapies combinées thrombolyse/ agent neuroprotecteur (Zhang et al. 2004). Cependant bien que ce modèle soit proche de la situation clinique il présente l'inconvénient de la variabilité de la composition du caillot formé et nécessite alors une standardisation dans sa préparation. Le modèle le plus fréquemment utilisé est un modèle mécanique d'**occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne** (MCAO). Ce protocole expérimental permet la modélisation d'une ischémie focale, permanente ou transitoire par l'introduction d'un filament de nylon au niveau de l'artère carotide interne jusqu'au cercle de Willis afin d'atteindre l'artère cérébrale moyenne.

Cette méthode induit une lésion corticale et sous corticale correspondant à la forme majoritaire des AVC traités en clinique. Bien que ce modèle mécanique soit plus éloigné de la situation clinique, il présente l'avantage d'induire une lésion focalisée de manière reproductible. Il permet de modéliser la phase aiguë de l'ischémie cérébrale, ainsi que des épisodes d'ischémie transitoire par retrait du fil occlusif. Le modèle MCAO par ischémie reperfusion induit une extension rapide de la lésion cérébrale au bout de 24 heures comparativement à d'autres modèles d'études, ce qui représente un avantage dans l'étude des stratégies neuroprotectrices (Woitzik et al. 2006).

L'étude de la perméabilité vasculaire est cependant limitée dans les modèles *in vivo*. On peut évaluer la rupture de la BHE par l'injection au moment de la reperfusion d'un marqueur d'intégrité comme le bleu Evans ou encore la peroxydase dont le passage au travers de la BHE est conditionnée par la rupture de celle-ci *via* une perte d'intégrité des jonctions serrées. Des analyses plus sensibles peuvent aujourd'hui être effectuées grâce à des techniques d'imagerie comme l'IRM (Imagerie par résonance magnétique) permettant de quantifier l'étendue des lésions constituées (oedème et hémorragie cérébrale) et également la visualisation de la rupture de la BHE par évaluation du passage de gadolinium (Durukan et al. 2009).

De nombreuses études d'ischémie/reperfusion *in vivo* utilisant ces techniques montrent un profil d'ouverture biphasique de la perméabilité de la BHE suite à l'ischémie-reperfusion avec une augmentation précoce suivie d'une période réfractaire pendant laquelle la BHE est refermée, avant la survenue d'une seconde augmentation retardée (Kuroiwa et al. 1985; Belayev et al. 1996; Rosenberg et al. 1998; Huang et al. 1999). En revanche, des études récentes mettent en avant l'absence de récupération la BHE suite à l'ischémie-reperfusion après la première augmentation de perméabilité (Kastrup et al. 1999; Wu et al. 2001; Nagel et al. 2004; Veltkamp et al. 2005) indiquant ici que la BHE reste ouverte pendant les jours (Nagel et al. 2008) et les semaines suivant l'AVC (Lin et al. 2002; Durukan et al. 2008; Strbian et al. 2008). Il n'y a pas actuellement pas d'explications définitives à cette dynamique d'ouverture de la BHE.

Animal	Technique	Mesure	Les phases	Références
Augmentation biphasique de la perméabilité vasculaire				
Chat	MCAO 1h	Extravasation du bleu Evans	1er Phase: Rapidement après la reperfusion. 2ème Phase: De 5h à 72h après la reperfusion	Kuroiwa et al., 1985
Rat	MCAO 2h	Extravasation du bleu Evans	1er Phase: Entre 3h et 5h après la reperfusion 2ème Phase: 48h après la reperfusion	Belayev et al., 1996
Rat	MCAO 2h	Extravasation du ¹⁴ C-sucrose	1er Phase: Après 3h de reperfusion 2ème Phase: 48h après la reperfusion	Rosenberg et al., 1998
Rat hypertendu	MCAO 2h	Extravasation du ³ H-sucrose	1er Phase: Dans la première heure de reperfusion 2ème Phase: Entre 22h et 46h après la reperfusion	Huang et al., 1999
Augmentation continue de la perméabilité vasculaire				
Rat Sprague-Dawley	MCAO 6h	Extravasation du Gd-DTPA	Augmentation progressive de la perméabilité de la BHE après 4h30 d'occlusion.	Kastrup et al., 1999
	MCAO 1h		Très faible augmentation de la perméabilité dans la phase précoce de reperfusion.	
	MCAO 3h		Extravasation du Gd-DTPA dès 3h30 de reperfusion.	
Rat Wistar	MCAO 2h	Extravasation du Gd-DTPA	Augmentation de la perméabilité jusqu'à 72h de reperfusion.	Nagel et al. 2004
Souris C57Bl/6	MCAO 2h	Passage de la fluoresceine	Augmentation significative de la perméabilité à 24h de reperfusion	Veltkamp et al., 2005
Rat Wistar	MCAO 90min	Extravasation du gadolinium	Perméabilité élevée jusqu'au 5 ^{ème} jour de reperfusion	Nagel et al., 2008
Rat Long-Evans	MCAO 60min	Extravasation du Gd-DTPA et du bleu Evans	Augmentation de la perméabilité au Gd-DTPA dès le 3 ^{ème} jour et ce jusqu'au 21 ^{ème} jour et confirmé au 7 ^{ème} jour par l'EBA.	Lin et al., 2008
Rat Wistar	MCAO 90min	Extravasation du Gd-DTPA et du bleu Evans	La perméabilité de la BHE augmente dès 25min de reperfusion. Elle reste élevée jusqu'à la 3 ^{ème} semaine pour l'EBA et la 5 ^{ème} semaine pour le Gd-DTPA.	Strbian et al., 2008
Rat	MCAO 90min	Extravasation du Gd-DTPA	La BHE garde une perméabilité élevée jusqu'à une semaine de reperfusion.	Durukan et al., 2009

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des résultats des études *in vivo* de la perméabilité de la BHE lors de l'ischémie reperfusion. GD-DTPA : gadolinium DTPA

Le tableau ci-dessus démontre la complexité de la réponse vasculaire aux mécanismes délétères de l'ischémie reperfusion qui dépend de l'animal, de l'intensité du stress appliqué, du suivi de la cinétique de reperfusion et également de la méthode de mesure plus ou moins sensible. De plus, le profil de perméabilité vasculaire lors de cette cinétique d'ouverture de la BHE correspond à l'intégration de mécanismes enclenchés lors de l'occlusion puis consécutivement à la reperfusion au sein de l'UNGV. Ces résultats illustrent la variabilité des modèles animaux qui va dépendre de l'espèce ou de la souche animale utilisée. En effet, chaque modèle animal sera utilisé afin d'étudier un phénomène précis de l'ischémie cérébrale. L'hétérogénéité de la pathologie humaine ne peut être recréée uniquement à l'aide d'un seul modèle animal (Durukan and Tatlisumak 2007). La plupart des études sont réalisées sur des rongeurs : le rat et

la souris. Le suivi à long terme de la survie apparaît plus difficile chez la souris, qui présente un taux de mortalité plus élevé, que chez le rat (Hoyte et al. 2004). Des souches différentes de rat présentent une susceptibilité différente à l'ischémie, le rat hypertendu est fréquemment utilisé pour l'étude de l'ischémie cérébrale à cause d'une plus grande susceptibilité à cette pathologie (McCabe et al. 2009). De plus un rat de souche Long Evans serait plutôt utilisé dans des études menées sur l'obésité mais également pour l'étude de l'ischémie cérébrale. Cette souche a montré le développement d'une lésion plus importante que la souche Sprague-Dawley sur un modèle de triple occlusion (Lin et al. 2008). La variabilité des modèles animaux pose le problème du transfert des résultats obtenus dans les études expérimentales à la physiopathologie humaine. Ainsi, la complexité des mécanismes mis en jeu montre la nécessité d'utilisation de modèles d'étude *in vitro* afin d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables des modifications de la perméabilité vasculaire. En effet, l'étude de la perméabilité de la BHE *in vivo* ne peut s'effectuer que par l'injection du traceur lors de la reperfusion et ne permet pas de mesurer les modifications précoces de la perméabilité consécutives à l'occlusion.

I.4.2 Etudes *in vitro*

La modélisation de l'ischémie cérébrale *in vitro* consiste en l'incubation de cultures cellulaires dans des conditions pathologiques pour lesquelles la composition de l'atmosphère ainsi que celle du milieu de culture sont contrôlées. De multiples modèles de culture cellulaire sont disponibles pour l'étude des conséquences des mécanismes physiopathologiques de l'ischémie comme l'excitotoxicité, le stress oxydant et l'apoptose sur les cellules neuronales et gliales (Yu et al. 2001; Zacco et al. 2003; Bonini et al. 2004; Harrison et al. 2005; Xu et al. 2009).

L'étude de la dysfonction de la BHE lors de l'ischémie cérébrale utilise des cultures de cellules endothéliales issues de capillaires cérébraux ou de microvaisseaux cérébraux cultivées sur un insert filtré. Cette modélisation permet la mesure de la perméabilité endothéliale par quantification du passage de composés au travers de la monocouche de cellules endothéliales. Ce type de culture permet également la mesure de la TEER (transendothelial resistance) qui donne une information sur la fonctionnalité des jonctions serrées.

La réponse des cellules endothéliales au stress de l'hypoxie ou de l'ischémie va dépendre de l'origine des cellules. Issues de porc, de bœuf, de rat ou de souris les cultures cellulaires présentent des différences de sensibilité conformément à ce qui est retrouvé dans les modèles animaux où le fond génétique prédispose à une susceptibilité plus importante. La réponse des cellules endothéliales aux stress est différente selon les conditions de culture du modèle

cellulaire. En effet, lorsque des cellules endothéliales porcines cultivées seules sont incubées dans des conditions d'hypoxie, de 1.5h à 24h sont nécessaires pour obtenir une augmentation de la perméabilité au saccharose et à l'inuline radio-marquées corrélée avec une diminution de la TEER alors que 24h d'hypoxie sont nécessaires à l'induction d'une augmentation de perméabilité pour les cellules endothéliales bovines (Mark and Davis 2002; Brown et al. 2003; Mark et al. 2004).

De plus, les cellules endothéliales sont moins sensibles lorsqu'elles ont été préalablement co-cultivées avec des astrocytes (Kondo et al. 1996; Fischer et al. 2000) ou des péricytes avant l'hypoxie (Hayashi et al. 2004). En effet, lorsque les cellules endothéliales bovines ont été préalablement co-cultivées avec des cellules gliales, 48h d'incubation des cellules endothéliales en condition d'hypoxie sont nécessaires pour induire une augmentation de la perméabilité au saccharose et à l'albumine (Plateel et al. 1995; Plateel et al. 1997).

Ainsi, la co-culture des cellules endothéliales avec des cellules gliales permet de recréer l'environnement cérébral au cours de la culture. Les cellules gliales sont capables d'induire et de maintenir les propriétés spécifiques de l'endothélium de la BHE et d'ainsi obtenir un phénotype de BHE établi. Ainsi, la réponse des cellules endothéliales dépend de la mise en place du phénotype de BHE lors des conditions de culture.

De plus, les modèles *in vitro* sont modulables et évolutifs. Les conditions de l'expérience peuvent être adaptées à des stress plus importants comme l'OGD (OGD : oxygen and glucose deprivation) où une augmentation de la perméabilité à des marqueurs d'intégrité de différents poids moléculaires (saccharose, à l'inuline, la transferrine et l'albumine) est mesurée dès 2h et 4h d'incubation (Abbruscato and Davis 1999; Brillault et al. 2002).

Ils peuvent également modéliser les phénomènes tardifs de la reperfusion, en incubant les cultures dans un milieu de réoxygénation après l'épisode hypoxie ou d'OGD. Dans ces conditions, l'épisode de réoxygénation apparaît délétère pour l'endothélium avec une augmentation de la perméabilité aux ions et au saccharose pouvant être induit par une réorganisation des jonctions serrées (Witt et al. 2005).

L'influence cellulaire peut également être étudiée dans les conditions pathologiques. Ainsi l'augmentation de la perméabilité endothéliale suite à l'OGD n'a été mesurée qu'en présence de cellules gliales dans un modèle de cellules endothéliales de BHE bovines co-cultivées avec des cellules gliales (Brillault et al. 2002). Cependant, un autre modèle de co-culture utilisant une

lignée de cellules gliales ne montre aucun effet des cellules gliales sur l'endothélium de la BHE dans les conditions d'OGD (Abbruscato and Davis 1999) ainsi que lors de la culture. Ceci démontre l'intérêt du choix des cultures cellulaires, afin d'utiliser des modèles *in vitro* capables de préserver les propriétés de chaque type cellulaire afin de mettre en évidence les influences cellulaires dans la physiologie mais surtout dans la réponse lors de pathologies.

Ces modèles *in vitro* présentent l'avantage d'identifier les acteurs moléculaires responsables de la réponse de l'endothélium. Une étude menée sur un modèle humain de co-culture de cellules endothéliales et d'astrocytes a montré la sécrétion des cytokines IL-8 et MCP-1 par les cellules endothéliales et gliales de rat (Zhang et al. 1999). Ce même groupe a démontré que la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les astrocytes induit une augmentation de l'expression des gènes IL-8, ICAM-1, E-selectin, IL-1 β , TNF- α et MCP-1 au niveau des cellules endothéliales (Zhang et al. 2000). D'autres approches moléculaires s'intéressent à la modulation des jonctions serrées par la mesure de l'expression des protéines des jonctions serrées ou encore leur délocalisation au sein de ces jonctions. Des études *in vitro* dans les conditions d'hypoxie ont montré une diminution de l'expression de la claudine-5 (Koto et al. 2007), ainsi qu'une délocalisation de ZO-1 et ZO-2 (Mark and Davis 2002) ou encore une diminution de l'expression des intégrines (Milner et al. 2008). Ces modifications s'accompagnent alors d'une diminution de la résistance électrique trans-endothéliale (Koto et al. 2007).

Les études *in vivo* et *in vitro* permettent de préciser nos connaissances des mécanismes physiopathologiques lors de l'ischémie cérébrale afin de développer des composés thérapeutiques ainsi que d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour le traitement des AVC.

II Les thérapies

Lors de l'ischémie, le temps est un paramètre important dans l'évolution de la taille de la lésion cérébrale. En 2006, Saver a d'ailleurs calculé l'impact d'une attaque cérébrale sur le tissu nerveux (Saver 2006). Il a alors estimé qu'un patient présentant les symptômes d'un AVC ischémique perd 120 millions de neurones, 830 milliard de synapses et 714 km de fibres myelinisées à chaque heure. Comparativement à la perte de neurones due au vieillissement, l'AVC ischémique accélère le vieillissement du cerveau à raison de 3,6 années à chaque heure où les symptômes ne sont pas traités. De plus, l'œdème vasogénique et la transformation

hémorragique sont les causes principales de décès précoces des patients souffrant d'un AVC ischémique. Dans ce contexte, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la rupture de la BHE devrait permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à la préserver, à diminuer l'œdème ainsi qu'à réduire le risque et la gravité de la transformation hémorragique.

II.1 Traiter la phase aiguë de l'ischémie

L'ensemble des stratégies thérapeutiques développées reposent essentiellement sur le concept de pénombre ischémique et ont pour but de sauver les neurones hypoxiés ou ischémiés mais encore viables localisés dans cette zone.

II.1.1 La reperfusion par thrombolyse

Afin de limiter la progression de la lésion cérébrale, la seule stratégie thérapeutique existante à ce jour lors de la phase aiguë de l'ischémie cérébrale consiste en la reperfusion par lyse du thrombus. Cette thérapie est la seule ayant démontré une amélioration des résultats cliniques en phase aiguë de l'ischémie (NINDS 1995). Cette stratégie consiste à accélérer et amplifier la fibrinolyse physiologique du caillot par l'administration pharmacologique d'un agent fibrinolytique. Les fibrinolytiques sont des molécules capables de promouvoir la conversion du plasminogène en plasmine qui va alors dissoudre le caillot. De nombreux agents fibrinolytiques ont été développés mais seul le rt-PA (recombinant tissue type plasminogen activator) qui est une sérine protéase a démontré des effets bénéfiques en phase aiguë de l'ischémie (NINDS 1995). Cependant, la reperfusion par rt-PA présente des effets secondaires au niveau du parenchyme cérébral et également au niveau vasculaire en induisant une augmentation de la fréquence et de la gravité de la transformation hémorragique du tissu cérébral ischémié. Il a été suggéré que le rt-PA présente en plus de sa fonction d'agent de lyse du caillot sanguin, des effets pléiotropes au sein de l'UNGV (Lo 2008). En effet, le rt-PA est, en réalité, capable d'atteindre le parenchyme cérébral en traversant la BHE intacte, sans modification de la perméabilité de celle-ci, par un mécanisme de transport saturable, indépendant de son activité protéolytique, *via* le récepteur LRP-1 (Benchenane et al. 2005). De plus, lors de l'ischémie cérébrale, l'augmentation de la perméabilité de la BHE induit une augmentation du passage du rt-PA *via* un mécanisme de transport non saturable. Le passage du rt-PA dans le parenchyme cérébral exacerbé lors de l'ischémie cérébrale est potentiellement néfaste car celui-ci est capable de cliver la sous unité NR1 du récepteur NMDA se traduisant par une potentialisation de

l'influx de calcium et par conséquent la mort neuronale (Wang et al. 2004). De plus le rt-PA a la capacité d'activer la protéolyse de la matrice extracellulaire par l'induction de la sécrétion de MMP en particulier la MMP-9 qui faciliterait la transformation hémorragique (Wang et al. 2004; Kelly et al. 2006) mais également par l'activation de cascades de signalisation induisant des dommages vasculaires comme la voie du NF- κ B (Yepes et al. 2009). De plus, une étude *in vivo* a permis également de mettre en évidence l'effet pro-hémorragique des produits de thrombolyse issus de la dégradation du caillot sur la paroi vasculaire (Gautier et al. 2003) et montré plus récemment chez l'homme (Kidwell et al. 2008).

Les limitations cliniques de l'utilisation du rt-PA conduisent à la recherche d'autres activateurs de plasminogènes. Le plus récent est le desmoteplase (DSPA : *Desmodus rotundus* Salivary Plasminogen activator) un activateur du plasminogène dérivé du DSPA α 1 (issu de la salive de chauve-souris) présentant une plus grande affinité pour la fibrine ainsi qu'une fenêtre thérapeutique plus grande que celle du rt-PA. Bien que l'étude clinique démontre une absence d'amélioration neurologique chez les patients, le DSPA présentait l'avantage de ne pas promouvoir l'excitotoxicité mais également de prévenir le passage du rt-PA au travers de la BHE lorsque les deux agents étaient co-administrés (Roussel et al. 2009).

Aujourd'hui, le choix de la thérapie thrombolytique est alors régi par l'état de la BHE après analyse en IRM (imagerie par résonance magnétique) afin de visualiser si il y a la formation d'un œdème vasogénique. L'indication de l'utilisation de cette thérapie est limitée à une fenêtre thérapeutique de trois heures et à des tailles d'infarctus modérés paramètres indiquant que la BHE à ce moment précis n'est pas rompue. L'ensemble de ces indications limite l'utilisation de la thrombolyse à tel point que seulement 5% des patients sont éligibles pour ce traitement (NINDS 1997). Cependant on tente aujourd'hui de s'aider de l'imagerie médicale afin de prolonger la fenêtre thérapeutique à 4h30 (Saver et al. 2009).

Une alternative à la thérapie thrombolytique serait l'administration de composés neuroprotecteurs capables de protéger les neurones de la mort lors de l'ischémie cérébrale et ainsi diminuer la taille de la lésion neuronale.

II.1.2 Les composés neuroprotecteurs

Compte tenu du nombre faible de patients éligibles pour la thrombolyse, de nombreux composés pharmaceutiques sont développés afin de limiter la progression de la lésion cérébrale. En effet, la cascade physiopathologique de l'ischémie cérébrale étant en partie identifiée, la stratégie est de développer des composés visant les différentes phases menant à la mort

neuronale (Green 2008). L'ensemble de ces composés vise l'excitotoxicité (antagonistes des récepteurs NMDA), les canaux ioniques (bloqueurs des canaux Ca^{2+} , Na^+ K^+), l'inflammation, le stress oxydant (piégeurs de radicaux libres) et l'apoptose. Cependant malgré les effets protecteurs observés dans les études précliniques, à ce jour aucune molécule n'a démontré cliniquement une protection efficace contre la mort neuronale lors de la phase aiguë de l'ischémie (figure 21) (Ducruet et al. 2009). La plupart des recherches menées sur les maladies cérébrales se focalisent encore sur les dommages aux neurones car la mort neuronale est la cause majeure des déficits cérébraux causés par les maladies neurologiques. Cependant l'ischémie cérébrale est avant tout une pathologie vasculaire complexe aux conséquences neuronales faisant intervenir l'ensemble de l'UNGV et dont la dysfonction est impliquée dans les dommages cérébraux par la survenue de l'oedème et/ou de l'hémorragie cérébrale.

Le bilan fait de l'ensemble des stratégies développées à ce jour met en avant l'importance de la prévention dans la survenue des pathologies cardiovasculaires. En réalité les AVC ne désignent pas une maladie proprement dite, mais un ensemble de pathologies caractérisées par l'apparition brutale de déficiences liées à des lésions cérébrales d'origine vasculaire. Ceci démontre l'importance de la prise en charge des facteurs de risques dans le cadre de la prévention primaire mais également en prévenant la récurrence par la prévention secondaire.

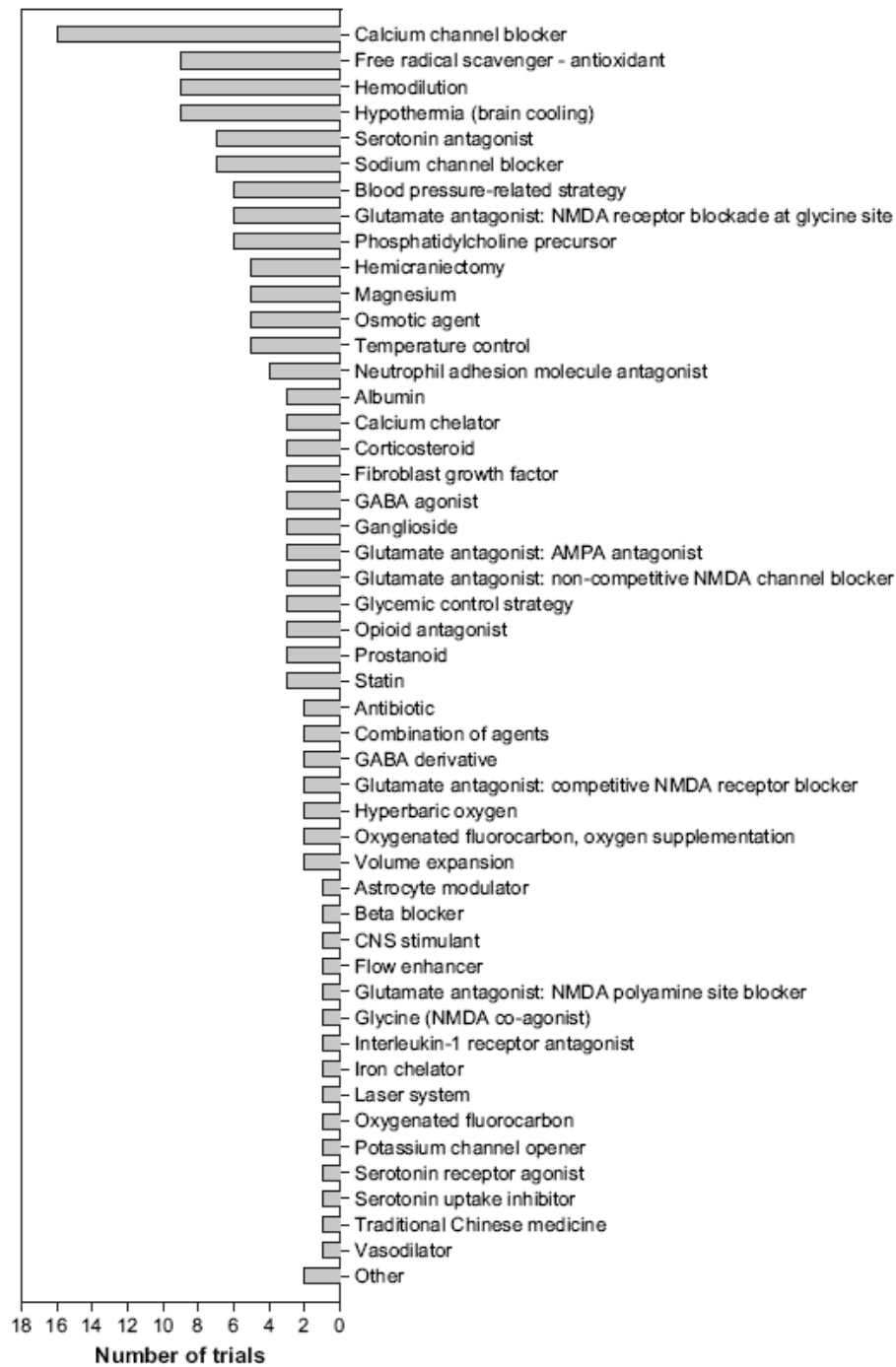


Figure 21 : Récapitulatif des molécules neuroprotectrices en essai clinique développées pour la phase aiguë de l'ischémie cérébrale d'après (Ginsberg 2008).

De plus ces pathologies sont complexes et cette complexité tient autant à la variété des lésions cérébrales observées qu'aux mécanismes physiologiques à l'origine des lésions. Ainsi, le traitement de l'ischémie cérébrale est limité à la restitution du flux sanguin, restreint qu'à 5% des patients, ainsi que la modulation de la cascade de coagulation durant la phase aiguë par l'administration d'aspirine (Donnan et al. 2008). L'échec durant ces vingt dernières années dans

le développement de nombreuses molécules à visée neuroprotectrice oriente les stratégies thérapeutiques vers la neuroprotection préventive touchant l'ensemble des cellules de l'UNGV.

II.2 Le concept de préconditionnement : induction de la résistance à l'ischémie.

Le concept de préconditionnement est né en 1985 lorsque des chercheurs ont montré que des occlusions coronariennes brèves (trop courtes pour provoquer une nécrose myocytaire) réalisées avant une occlusion prolongée (de durée suffisante pour provoquer un infarctus myocardique) peuvent réduire de façon très importante (50 % à 75 %) la taille finale de l'infarctus. Le fait de rendre le myocarde brièvement ischémique induit une protection endogène qui s'exprime lors d'une ischémie prolongée consécutive. Ce phénomène a été nommé preconditioning (préconditionnement). Tout se passe comme si le myocarde, « prévenu » par une première agression (ici de nature ischémique), mettait en jeu des mécanismes endogènes de défense le rendant capable de mieux tolérer une nouvelle agression à venir : il s'agit là d'un phénomène d'adaptation au stress (Murry et al. 1986).

Lors de l'ischémie cérébrale, la cascade physiopathologique déclenche de nombreux processus délétères menant à la mort neuronale. Cependant, parallèlement à la survenue de ces mécanismes le cerveau est capable d'induire des mécanismes endogènes de protection contre les atteintes cérébrales. Ces mécanismes peuvent être déclenchés de manière préventive avant le début de l'attaque cérébrale. Le préconditionnement fait référence au processus naturel d'adaptation qui peut être induit par une stimulation de faible amplitude n'entraînant pas de lésion mais capable d'induire un phénotype de tolérance à une stimulation beaucoup plus sévère qui surviendrait plus tardivement. En ce sens, le préconditionnement ischémique correspond à des périodes d'ischémies brèves, incapables par elles mêmes d'entraîner l'apparition de lésions cérébrales mais qui appliquées avant une ischémie prolongée, en diminuent le volume (Bordet 2002).

Deux périodes de tolérance peuvent être induites par le préconditionnement. La première phase précoce apparaît très rapidement, dans les minutes suivant la stimulation préconditionnante et résulte de réponses post transcriptionnelles. La seconde phase, retardée mais durable, survient après un délai de 24h avec un pic maximal à trois jours qui diminue jusqu'au septième jour. Au niveau cérébral, les mécanismes retardés prédominent et le délai d'apparition de la protection correspond au temps nécessaire à la mise en place de mécanismes de cytoprotection médiés par la synthèse de nouvelles protéines. Les inducteurs de préconditionnement peuvent être de

natures différentes suggérant que les mécanismes mis en jeu convergent vers des voies de signalisation induisant le développement d'un phénotype de tolérance.

Inducteurs de la tolérance à l'ischémie	Inducteurs de la tolérance croisée
Ischémie globale non léthale	Hyperthermie
Bref épisode d'ischémie focale transitoire	Anoxie/hypoxie
	Epilepsie
	Inhibition de la phosphorylation oxydative
	Stress oxydant
	Traitement au lipopolysaccharide
	Traumatisme crânien
	Hypothermie

Tableau 4 : Liste des inducteurs de tolérance à l'ischémie selon (Kirino 2002). On appelle tolérance croisée à l'ischémie, une tolérance à l'ischémie induite par un stress de nature différente.

De nombreuses études *in vivo* mais également *in vitro* sur des cultures de neurones ou encore des coupes de cerveau se sont intéressées aux mécanismes de la tolérance neuronale à l'ischémie (Cadet and Krasnova 2009). Ces mécanismes sont complexes, ils impliquent à la fois la diminution des phénomènes délétères connus lors de l'ischémie cérébrale (excitotoxicité, stress oxydant, inflammation et apoptose) mais également la mise en place de mécanismes de résistance. L'induction de la tolérance à l'ischémie dépend de la réponse coordonnée au niveau génomique, moléculaire, cellulaire et tissulaire. Ils comprennent des remaniements génomiques, biochimiques et neurophysiologiques. En réalité, le préconditionnement stimule une reprogrammation génomique qui confère aux cellules un phénotype de tolérance (Stenzel-Poore et al. 2003; Stenzel-Poore et al. 2004).

De plus, le préconditionnement ischémique induit une activation de l'ensemble des cellules de l'UNGV. Les effets protecteurs ne sont pas limités aux neurones mais s'étendent aux cellules gliales ainsi qu'aux vaisseaux.

Les effets protecteurs du préconditionnement au niveau vasculaire ont été observés *in vivo*. La réactivité endothéliale serait préservée lors de la reperfusion dans les zones périphériques à la lésion suite à un préconditionnement au LPS chez la souris (Kunz et al. 2007). Des expériences montrent que suite à un préconditionnement hypoxique ou ischémique, la protection pourrait limiter la formation de l'œdème (Masada et al. 2001), diminuer l'expression de MMP-9 (Zhang et al. 2006), ou l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales *via* une diminution de l'expression d'ICAM-1 (Zhou et al. 2003).

Membrane stabilization and inhibition of excitability
Adenosine
ATP-sensitive K ⁺ channel
GluR2
Reduced circuit excitability in the hippocampus
Cell protection and inhibition of apoptosis
Protein phosphorylation
By inhibition: CaM kinase II, mitogen-activated protein kinases
By activation: Akt
Nitric oxide production
Raf, Mek, Erk
Immediate early genes
c-Jun, c-Fos
Inhibition of apoptosis
Reduction of p53
Increased expression of Bcl-2
Protection by cytokines
Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , ceramide
Inflammation-related protection
Nuclear factor- κ B, by inducing MnSOD and Bcl-2
Glial cell proliferation
Stress response
Chaperoning unfolded protein
Reducing endoplasmic reticulum stress
Recovery of normal protein synthesis

Tableau 5 : Listes des mécanismes potentiels impliqués dans la tolérance à l'ischémie d'après (Kirino 2002).

Des effets protecteurs ont également été rapportés par des études *in vitro* qui montrent que suite à un préconditionnement en OGD, on observe la préservation de la faible perméabilité de la BHE ainsi qu'une diminution de l'expression de molécules de l'inflammation ICAM-1 et VCAM-1 (Andjelkovic et al. 2003; An and Xue 2009) et également un maintien de la structure des jonctions serrées (An and Xue 2009). Un préconditionnement au stress oxydant d'une culture de cellules endothéliale de veine ombilicale a montré une diminution de la sécrétion de cytokines et d'expression de molécules d'adhésion suite à la stimulation par le TNF- α (Zahler et al. 2000).

L'étude de la protection préventive représente un axe de recherche pertinent du point de vue clinique car de récentes études démontrent que l'activité physique ou encore les traitements aux hypolipémiants réduisent la survenue et la sévérité des attaques (Amarenco 2001; Bloomfield Rubins et al. 2001; Deplanque et al. 2006).

De plus les effets du préconditionnement ischémique sont observés en clinique dans deux études démontrant que la sévérité des ischémies constituées était moins importante lorsqu'elles survenaient chez des patients ayant eu préalablement un accident ischémique transitoire (AIT) (Weih et al. 1999) (Moncayo et al. 2000).

L'étude de la résistance à l'ischémie et de ses mécanismes constitue alors une nouvelle voie pour la découverte de cibles pharmacologiques dont l'activation pourrait contribuer à l'induction de la neuroprotection préventive. L'identification des mécanismes permettrait l'utilisation d'agents pharmacologiques qui mimant les mécanismes biologiques observés au cours de la résistance cérébrale à l'ischémie, pourraient augmenter la résistance cérébrale chez les patients à haut risque de développer un AVC ischémique.

II.3 Les molécules à effet pléiotrope

Le traitement de l'ischémie cérébrale est limité à la prévention des risques cardiovasculaires ainsi que la modulation de la cascade de coagulation durant la phase aiguë. Durant ces vingt dernières années, de nombreuses molécules ont été développées afin d'induire une neuroprotection. La neuroprotection peut être définie comme une stratégie ou une combinaison de stratégies qui peut inhiber, interrompre ou ralentir les événements cellulaires et moléculaires qui conduisent à des lésions ischémiques irréversibles. Mais de façon générale, l'ensemble des composés évalués en tant que neuroprotecteurs de la phase aiguë des AVC ischémiques s'est révélé inactif malgré des preuves d'activité sur les modèles animaux (Ginsberg 2008). Une des explications à cet échec, serait que chaque composé développé ne cible qu'une seule voie de signalisation de la cascade pathologique, alors qu'en réalité l'ischémie cérébrale implique de nombreuses voies activées dans les différents types cellulaires et se manifestant également chronologiquement au cours du temps. Une des solutions à cela serait une approche intégrée induisant une modulation simultanée des différentes voies impliquées dans la physiopathologie en utilisant un agent pharmacologique démontrant une action pléiotrope. Un tel effet pléiotrope peut être induit par des médicaments activant des récepteurs facteurs de transcription, appelés récepteurs nucléaires, car ces sous-types de récepteurs sont capable de réguler simultanément l'expression de nombreux gènes dans les types cellulaires constituant l'UNGV.

II.3.1 Les agonistes des récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor)

II.3.1.1 Structure des récepteurs PPAR

Les récepteurs PPAR appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires. Il existe trois types de récepteurs PPAR: PPAR- α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) et PPAR- γ (NR1C3) codés par des gènes différents. Les récepteurs PPARs sont capables, une fois activés par leur ligand de se

dimériser avec le récepteur à l'acide rétinoïque (RXR : retinoic X receptor) et de se fixer sur leur élément de réponse (PPRE : peroxisome proliferator response element) dans la région promotrice de gènes cibles afin d'en réguler l'expression. La structure des récepteurs PPAR comporte plusieurs domaines (figure 22).

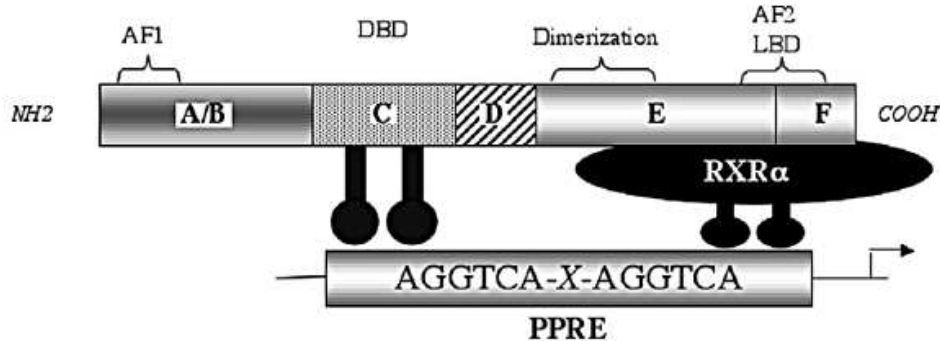


Figure 22 : Structure des récepteurs PPAR selon (Diradourian et al. 2005).

Représentation schématique des domaines fonctionnels des récepteurs PPAR. Ils comportent le domaine A/B colocalisé à l'extrémité amino terminale avec la fonction AF1 qui régule la phosphorylation, le domaine C responsable de la liaison à l'ADN. Le domaine D est la région de liaison aux cofacteurs et enfin le domaine E/F favorise la dimérisation et comporte la fonction AF-2 responsable de l'activation suite à la liaison du ligand au niveau du LBD dépendante du ligand. AF-1 : ligand independent activating function-1; DBD: DNA binding domain; AF2 : ligand dependant activating domain 2; LBD: ligand binding domain; PPRE: Peroxisome proliferators-activated receptor response element.

Le domaine AF2 (activating function 2) est un domaine de transactivation qui répond à la liaison entre le récepteur et son ligand spécifique au niveau du domaine LBD (Ligand binding domain) en changeant de conformation afin de favoriser sa dimérisation avec RXR. Cette activation favorise la liaison à l'ADN *via* le domaine DBD (DNA binding domain) au niveau du PPRE. Le domaine A/B comporte la fonction AF-1 (ligand independant activating function-1) qui régule indépendamment de la liaison du ligand, la fonction de PPAR par des phosphorylations.

Le PPRE est une structure DR-1 (direct repeat-1) qui consiste en deux répétitions d'une séquence hexanucléotidique (AGGTCA) séparées par un seul nucléotide. Ce motif DR-1 est spécifique à l'hétérodimère PPAR-RXR. Bien que la structure générale de ces récepteurs nucléaires soit conservée et en particulier celle du DBD, une grande divergence est présente au niveau du domaine LBD, ce qui définit l'interaction spécifique entre le ligand et les sous types de récepteurs PPAR.

II.3.1.2 Localisation et expression tissulaire des récepteurs PPAR

Les récepteurs PPAR sont impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique et leur localisation est concentrée dans les tissus et les cellules liés à cette fonction (Desvergne and Wahli 1999; Lefebvre et al. 2006). Le PPAR- α impliqué dans le métabolisme des acides gras est fortement exprimé dans le foie, le rein, le cœur, les muscles et le tissu adipeux brun, dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Le PPAR- γ , régulant le métabolisme glucidique est localisé au niveau du tissu adipeux blanc et des intestins, dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages.

Mais plus récemment, l'expression des récepteurs PPAR a été localisée dans le SNC, au niveau des neurones, des cellules endothéliales ainsi que dans les cellules gliales démontrant le rôle potentiel de ces récepteurs dans les pathologies cérébrales (Moreno et al. 2004). L'expression de PPAR- β/δ a été retrouvée dans des zones du cerveau où PPAR- α et PPAR- γ sont absents (Moreno et al. 2004).

II.3.1.3 Les agonistes des récepteurs PPAR

Le récepteur **PPAR- α** est activé par des ligands naturels qui sont des dérivés d'acides gras insaturés comme l'acide docosahexaénoïque (DHA), l'acide éicosapentanoïque (EPA) et les phospholipides oxydés. Les ligands naturels du récepteur **PPAR- γ** sont également des acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléïque et l'acide arachidonique mais également des dérivés de prostaglandines comme le 15-PGJ2 (15-deoxy-delta12-14-Prostaglandine J2) ou encore des lipides oxydés comme le 9-HOTE (acide 9-hydroxyoctadecatriénoïque), 13-HODE (acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque) et le 15-HETE (acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque) (tableau 6). La régulation de l'activation des récepteurs PPAR par les ligands endogènes dépend de la synthèse de ces ligands par le métabolisme lipidique. Dans les conditions physiologiques, les récepteurs PPAR agiraient comme des capteurs du contenu lipidique capables de transcrire les modulations du contenu en lipides et en acides gras provenant de l'alimentation en activité métabolique soit en faveur du catabolisme des acides gras pour l'apport énergétique ou alors vers le stockage des lipides. Dans les conditions inflammatoires, les récepteurs PPAR peuvent également être activés par des dérivés éicosanoïdes produits par le métabolisme de l'acide arachidonique et des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (Michalik et al. 2006).

PPAR- α	PPAR- β/δ	PPAR- γ
Les ligands naturels		
Acide arachidonique	Acide arachidonique	Acide arachidonique
Acide linoléique	Acide linoléique	Acide linoléique
Acide oléique		15d-PGJ2
Acide stéarique		9-HODE
Acide palmitique		13-HODE
Acide palmitoléique		15-HETE
Acide eicosapentanoïque		
Les ligands exogènes		
WY-14643	L-165041	Rosiglitazone
Clofibrate		Ciglitazone
Gemfibrozil		Troglitazone
Nafénopine		Pioglitazone
Bézafibrate		
Fénofibrate		

Tableau 6 : Liste des ligands endogènes et exogènes des récepteurs PPAR.

15-PGJ2 : 15-deoxy-delta12-14-Prostaglandine J2 ; **9-HOTE** : acide 9-hydroxyoctadecatrienoïque ; **13-HODE** : acide 13-hydroxyoctadecadienoïque ; **15-HETE** : acide 15-hydroxyeicosatetraenoïque ; **WY-14643** :N-(3-[2-quinolylmethoxy]phenyl)-trifluoromethanesulphonamide; **L-165041** :4-[3-(4-acetyl-3-hydroxy-2-propoxylphenoxy) propoxyl phenoxy]acetic acid.

Les récepteurs PPAR peuvent aussi être activés pharmacologiquement par des composés de synthèse qui appartiennent à la famille des fibrates pour PPAR- α comme le fénofibrate et le gemfibrozil. Les agonistes de synthèse de PPAR- γ sont des thiazolidinediones (TZDs) dont les plus connus sont le ciglitazone, le pioglitazone, la rosigitazone et le troglitazone utilisés en clinique pour le traitement du diabète de type 2.

II.3.1.4 Mécanismes d'action des récepteurs PPAR

L'activation des récepteurs PPAR par leur ligand entraîne deux mécanismes de régulation de la transcription. Le premier mécanisme consiste en la liaison de l'hétérodimère PPAR-RXR sur son PPRE dans la zone promotrice de gènes cibles afin d'activer ou d'inhiber leur expression. Ce mécanisme PPRE dépendant est un mécanisme lent, correspond à la **transactivation**. Mais les récepteurs PPAR sont capables de réguler la transcription *via* un mécanisme de **transrépression** (Ricote and Glass 2007), qui est un mécanisme rapide PPRE-indépendant, puisqu'il ne nécessite pas la liaison au PPRE mais l'interaction de type protéine-protéine de PPAR avec d'autres facteurs de transcription comme le NF- κ B de STAT-3 et AP-1 afin d'inhiber leur activité (Delerive et al. 1999) (figure 23).

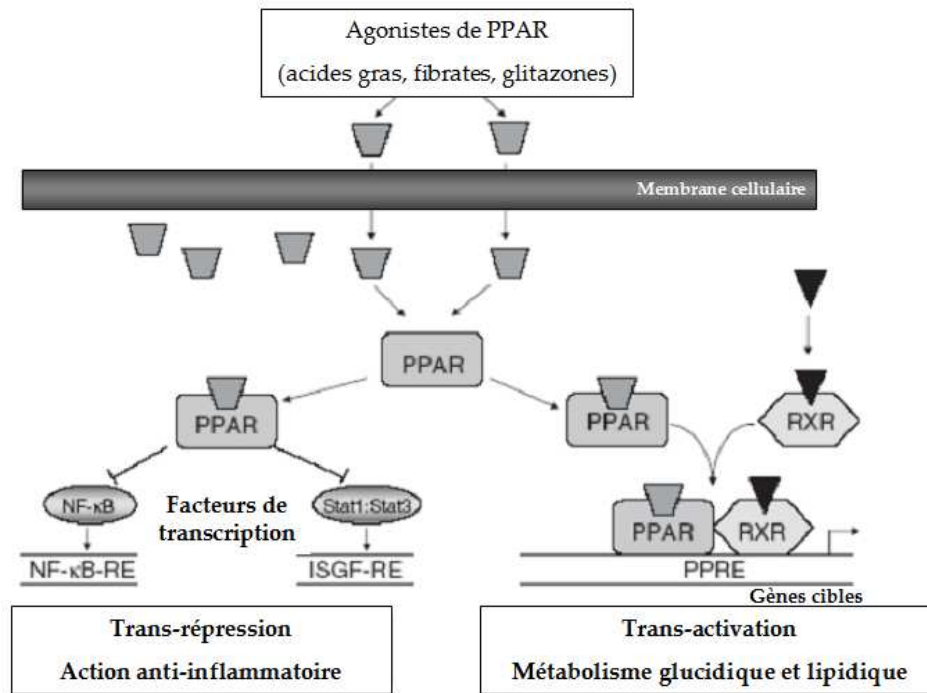


Figure 23 : Mécanismes de régulation de la transcription par les récepteurs PPAR d'après (Touyz and Schiffrin 2006).

II.3.1.5 Les récepteurs PPARs et l'ischémie cérébrale

Les récepteurs PPAR- α et PPAR- γ sont impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique, ce qui les identifie comme des cibles thérapeutiques importantes pour le traitement des facteurs de risque de l'ischémie cérébrale. En effet, l'activation de ces deux récepteurs est impliquée dans la modulation de l'athérosclérose et du diabète. Une étude clinique a montré une diminution de l'incidence de l'attaque cérébrale chez des patients à haut risque traités par un hypolipémiant agoniste de PPAR- α , le gemfibrozil (Bloomfield Rubins et al. 2001). Dans cette étude, l'effet protecteur passait par une amélioration des paramètres lipidiques. Cependant plus récemment, en raison des nombreux effets pléiotropes indépendants des effets sur le métabolisme, l'activation des récepteurs PPARs pourrait également présenter un effet protecteur lors de l'ischémie cérébrale.

De nombreuses études *in vivo* montrent l'implication de **PPAR- α dans la neuroprotection** lors de l'ischémie-reperfusion suite à des traitements par des agonistes du PPAR- α comme le fénofibrate, le WY-14643 ainsi que le révestradol (un polyphénol présent dans le raisin) (Collino et al. 2006) (Deplanque et al. 2003; Inoue et al. 2003) mesuré chez la souris suite à

l'ischémie/reperfusion. Les effets protecteurs mesurés induisaient une diminution de la taille de la lésion cérébrale. Les mécanismes suggérés seraient des **effets anti-inflammatoires** qui passeraient par une diminution de l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 au niveau des cellules endothéliales. Les agonistes PPAR- α présenteraient également un effet protecteur *via* des **effets anti-oxydants** : par la modulation de la production de ROS (Collino et al. 2006) *via* une augmentation de l'expression et de l'activité d'enzyme anti-oxydantes comme la Cu/Zn SOD dans les cellules endothéliales (Inoue et al. 2001) (Deplanque et al. 2003) ainsi qu'une diminution de l'activation de la iNOS (Collino et al. 2006). Ces effets protecteurs pourraient également être en partie médiés par l'inhibition de la voie du NF κ B, par l'induction de l'expression de son inhibiteur I κ B, et de la protéine kinase p38 (Collino et al. 2006). Les effets protecteurs *in vivo* ont pu être mesurés suite à des traitements préventifs (Deplanque et al. 2003) (Inoue et al. 2003) ou suite à l'administration du composé lors de la reperfusion (Collino et al. 2006).

Les effets protecteurs d'agonistes de PPAR- γ ont fait l'objet de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* suggérant une **modulation du stress oxydant**. En effet, les agonistes de PPAR- γ seraient capables d'activer l'expression de la Cu-Zn SOD (Inoue et al. 2001; Shimazu et al. 2005), ainsi que de diminuer la production de ROS *via* l'inhibition de COX2, IL1- β (Sundararajan et al. 2005), la iNOS (source importante de peroxy-nitrite) sur un modèle d'ischémie permanente (Pereira et al. 2005) ainsi que de diminuer l'activation des cellules microgliales (Bernardo and Minghetti 2006). L'activation de PPAR- γ pourraient également **moduler la réponse inflammatoire** en diminuant l'expression de ICAM-1, de MMP-9 ainsi que de cytokines (Luo et al. 2006) *via* l'inhibition de la voie du NF- κ B et du TNF α (Pantoni et al. 1998; Mabuchi et al. 2000) mais également en inhibant l'activation des macrophages et des cellules microgliales prévenant ainsi la production de cytokines (Kielian and Drew 2003). Une étude suggère également que les agonistes PPAR- γ pourraient **inhiber la mort neuronale** induite par la surexpression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) montrée chez le rat suite à l'ischémie reperfusion et également sur une culture de neurones dans des conditions de stress oxydant (Zhao et al. 2006b).

Les récepteurs PPAR- α et PPAR- γ présentent des effets protecteurs qui pourraient s'avérer complémentaires et synergiques. On tente aujourd'hui de développer des agonistes capables d'activer simultanément ces deux récepteurs nucléaires (Balakumar et al. 2007).

L'implication du **récepteur PPAR- β/δ** a été suggérée dans une étude démontrant que les souris déficientes pour le gène de PPAR- β/δ présentent une plus grande susceptibilité à l'ischémie cérébrale (Arsenijevic et al. 2006). En effet, le traitement par des agonistes spécifiques PPAR- β/δ a montré *in vivo* un effet neuroprotecteur et anti-apoptotique *in vitro* sur une culture de neurones traités par des agents neurotoxiques (Iwashita et al. 2007). Bien que le récepteur PPAR- β/δ soit présent de manière abondante dans le cerveau, l'absence d'utilisation d'agoniste PPAR- β/δ en clinique pourrait expliquer le peu de connaissances concernant ce récepteur nucléaire dans la pathologie de l'ischémie. Cependant, il pourrait avoir une utilité thérapeutique dans le syndrome métabolique par une augmentation du catabolisme des acides gras dans le muscle squelettique et le tissu adipeux (Luquet et al. 2005).

Les mécanismes par lesquels les PPARs exercent les effets protecteurs observés *in vivo* restent à préciser bien que les pistes de l'inflammation et du stress oxydant soient les plus étudiées.

II.3.2 Les Statines

Les statines sont des composés prescrits à des patients présentant des pathologies métaboliques. Le rôle des statines est d'inhiber la synthèse *de novo* de cholestérol par l'inhibition d'une enzyme, la HMG-CoA (3-hydroxy 3-méthylglutaryl coenzyme A) réductase. Cette enzyme présente dans le foie et dans les tissus non hépatiques est une enzyme limitante pour la synthèse de cholestérol. Elle catalyse la conversion de l'HMG-CoA en mévalonate, un précurseur du cholestérol. Les statines par leur analogie de structure avec l'HMG-CoA inhibent de manière compétitive l'activité de l'HMG-CoA reductase. Ainsi, les statines réduisent le contenu en cholestérol hépatique par une boucle de rétrocontrôle négatif des récepteurs au LDL ce qui provoque une diminution du taux sérique en cholestérol.

En plus de leur action sur la synthèse du cholestérol, les statines présenteraient des effets pléiotropes au niveau vasculaire (Endres 2005) incluant une amélioration de la fonction endothéliale, une augmentation de la biodisponibilité du NO, une modulation de la réponse inflammatoire, des propriétés anti-oxydantes, des actions immunomodulatrices ainsi que la stabilisation de la plaque d'athérome (Davignon 2004).

La diminution du taux de cholestérol apparaîtrait comme le mécanisme principal d'action des statines. En effet, par l'inhibition de la synthèse du cholestérol, les statines inhibent également

un certain nombre d'intermédiaires isoprénoïdes impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques. Ainsi il y a très peu d'effets des statines qui soient indépendants de l'effet sur la synthèse de cholestérol.

Des études expérimentales *in vivo* sont permis de montrer qu'un traitement prophylactique de 14 jours (Endres et al. 1998; Laufs et al. 2000; Laufs et al. 2002; Sironi et al. 2006) ou un traitement en aiguë (Ding et al. 2006; Berger et al. 2008; Prinz et al. 2008) avec différents inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (atorvastatine, lovastatine, pravastatine, rosuvastatine et simvastatine) provoquaient en l'absence de désordre lipidique et de manière dose dépendante une amélioration du déficit neurologique chez l'animal en épisode ischémique.

Des études suggèrent que ce résultat pourrait impliquer une amélioration de la fonction endothéliale *via* augmentation de l'expression de la eNOS (Asahi et al. 2005) ou encore l'inhibition de la voie du NF- κ B (Sironi et al. 2006). D'autres mécanismes sont également évoqués, comme la modulation du stress oxydant *via* l'inhibition de l'activité NADPH oxydase (Endres and Laufs 2004) ainsi que par le maintien de l'activité de la Cu/Zn SOD (Kumagai et al. 2004) ou encore une action sur les événements inflammatoires suggérée par une étude montrant une diminution de l'expression de certaines molécules d'adhésion (Chung et al. 2002) (Okouchi et al. 2003). Cependant le rôle sur les molécules d'inflammation est encore controversé puisqu'une étude a montré une induction de certaines molécules d'adhésion par la lovastatine (Schmidt et al. 2002).

Plusieurs études *in vivo* montrent une diminution de la mort neuronale suite à l'ischémie reperfusion (Daimon et al. 2004; Kumagai et al. 2004; Kurosaki et al. 2004) ou encore *in vitro* contre l'excitotoxicité sur des neurones en culture (Zacco et al. 2003). La fluvastatin a montré un effet protecteur *in vitro* sur un modèle de BHE utilisant une lignée de cellules endothéliales, en préservant la résistance transendothéliale de l'excitotoxicité du glutamate *via* un mécanisme dépendant du NO (Kuhlmann et al. 2008). Un traitement à la simvastatine a diminué production de MMP-9 par les astrocytes activés par le rt-PA (Wang et al. 2006). L'ensemble de ces résultats démontre que les statines pourraient présenter des effets bénéfiques sur les cellules de l'UNGV lors de l'ischémie cérébrale. Cependant des investigations plus approfondies sont nécessaires afin de valider ces hypothèses et d'identifier les mécanismes potentiellement impliqués dans la protection observée bien qu'aujourd'hui aucune étude épidémiologique n'ait démontré le lien entre le cholestérol et l'ischémie cérébrale (Amarenco et al. 2009).

Des études ont démontré que les effets des statines pourraient agir *via* des mécanismes impliquant la voie des récepteurs nucléaires PPAR. Cet effet passerait par une augmentation de l'expression de PPAR- α ainsi qu'une augmentation de son activité transcriptionnelle (Martin et al. 2001; Jasinska et al. 2007; Paumelle and Staels 2008).

Conclusion de l'étude bibliographique

La BHE est essentielle dans le maintien de l'homéostasie cérébrale. Elle possède des propriétés structurales et biochimiques restreignant les échanges non spécifiques entre le sang et le système nerveux central. Cependant bien que les cellules endothéliales des capillaires cérébraux soient le siège de la BHE, l'induction et le maintien de ses propriétés restrictives nécessite l'intercommunication au sein de l'UNGV qui comprend les neurones, les péricytes, les astrocytes, les cellules microgliales et qui s'étend au niveau vasculaire des artérioles jusqu'aux veinules. Dans les conditions physiologiques, les communications au sein de cette unité modulent et adaptent les propriétés des microvaisseaux en réponse aux variations de l'activité cérébrale.

Cependant la perméabilité des vaisseaux sanguins cérébraux peut être également modulée dans les conditions pathologiques comme l'ischémie cérébrale. Elle met en jeu des mécanismes complexes activant l'ensemble des cellules de l'UNGV induisant la mort neuronale mais également une atteinte vasculaire. L'augmentation précoce de la perméabilité de la BHE lors de l'ischémie représente une étape préliminaire dans la perte d'intégrité vasculaire qui se traduit par la formation d'un œdème vasogénique et dans les cas les plus graves se transforme en une hémorragie cérébrale. Ainsi cela démontre l'intérêt de l'étude des mécanismes impliqués dans la dysfonction vasculaire lors de l'ischémie cérébrale. De plus, le développement de stratégies thérapeutiques préventives utilisant des composés à effet pléiotrope capables de préserver l'intégrité vasculaire et touchant l'ensemble de l'UNGV semble représenter à ce jour une alternative à l'échec de la neuroprotection en phase aiguë de l'ischémie.

**Etude de l'effet d'un agoniste du récepteur nucléaire PPAR- α
sur la perméabilité de la BHE lors de ischémie cérébrale**

Introduction

L'échec de l'industrie pharmaceutique dans le développement de molécules neuroprotectrices ainsi que le faible taux d'éligibilité des patients présentant un AVC à la thérapie thrombolytique orientent aujourd'hui la recherche vers le développement de stratégies préventives. Il existe en effet un lien entre les maladies cardiovasculaires et le risque de développer un AVC. Des études cliniques ont démontré que le risque de survenue d'une attaque cérébrale augmente avec le syndrome métabolique (Bloomfield Rubins et al. 2001). C'est sur ces observations qu'une étude clinique a été menée afin d'étudier l'effet d'un traitement par un hypolipémiant, le gemfibrozil agoniste du récepteur nucléaire PPAR- α . Cette étude démontre que l'administration du composé en traitement préventif présente un effet bénéfique sur l'incidence et la sévérité des AVC chez les patients à haut risque. Cette protection apparaît par l'amélioration des paramètres lipidiques (Amarenco 2001). Une étude *in vivo* menée chez la souris montre qu'un traitement préventif de 14 jours au fénofibrate, un autre agoniste de PPAR- α , diminue la taille de la lésion cérébrale mais sans modifier les paramètres lipidiques (Deplanque et al. 2003). Dans cette étude, l'utilisation dans les conditions physiologiques du modèle *in vitro* de BHE bovine développé au laboratoire a permis de montrer qu'en réalité l'acide fénofibrique, le métabolite actif du fénofibrate, ne passe que très faiblement au travers de l'endothélium des capillaires cérébraux et par conséquent atteint très peu les neurones. Cette observation a suggéré que l'effet observé par ce traitement préventif résulterait d'avantage d'une action au niveau de la BHE, qu'une action sur les neurones.

C'est dans ce contexte que nous avons débuté l'étude de l'effet de l'acide fénofibrique sur la BHE dans des conditions d'ischémie.

Résultats

Afin d'étudier les conséquences de l'ischémie cérébrale sur la perméabilité de la BHE, nous disposons au laboratoire d'un modèle primaire de BHE syngénique murin, développé initialement pour l'étude des phénomènes inflammatoires (Coisne et al. 2005; Coisne et al. 2006), qui consiste en une co-culture de cellules endothéliales issues d'une fraction de microvaisseaux enrichie en capillaires cérébraux, avec des cellules gliales.

Nous avons adapté sur ce modèle la condition ischémique *in vitro* appelée OGD (oxygène-glucose deprivation), initialement développée sur le modèle bovin par Julien Brillault dans le but de mimer les conséquences immédiates de l'occlusion (Brillault et al. 2002).

A l'issue de la mise au point expérimentale, nous avons obtenu, après quatre heures d'incubation en OGD, une augmentation de la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales au jaune Lucifer, un marqueur d'intégrité de la BHE connu pour ne passer que faiblement au travers des cellules endothéliales (figure1). De plus, l'augmentation de la perméabilité de la monocouche en OGD dépend de la présence des cellules gliales. Ces résultats concordent avec l'étude menée sur le modèle bovin puisque cette augmentation de la perméabilité n'est pas mesurée en absence des cellules gliales, suggérant la sécrétion de facteurs solubles par ces cellules gliales nécessaires à l'augmentation de la perméabilité endothéliale (Brillault et al. 2002).

Dans ces conditions, nous avons fait l'essai de traitements préventifs à l'acide fénofibrique. Pour cela nous avons testé deux types de traitement ; le premier consiste à ajouter le composé dans le compartiment luminal afin de mimer l'apport sanguin 24 heures avant l'expérience et le second à l'ajout du composé au moment de l'incubation en OGD. Une expérience de dose réponse a permis d'observer dans les deux cas une restriction de l'hyperperméabilité induite par l'OGD dont l'efficacité était maximale à 100 μ M d'acide fénofibrique (figure 2A). De plus, cette concentration correspond à la concentration plasmatique d'acide fénofibrique dosée chez le rat après 14 jours de traitement au fénofibrate (résultat non montré). L'addition de ces deux traitements ne montre pas d'effet synergique, ce qui suggère un mécanisme commun (figure 2B). Cette protection apparaît sans modification visible des jonctions serrées, observée dans l'ensemble de nos conditions expérimentales (figure 2C).

Ainsi nous avons pu démontrer que l'acide fénofibrique en traitement préventif protège la BHE lors de l'ischémie cérébrale, en limitant l'hyperperméabilité induite par les conditions d'OGD.

Afin de connaître plus précisément la cinétique de protection induite par le fénofibrate, nous avons effectué d'autres expériences en retardant l'administration du composé à la fin de l'incubation en OGD, c'est-à-dire lorsque la perméabilité de l'endothélium est déjà augmentée. Ainsi, l'acide fénofibrique à 100 μ M a été ajouté après quatre heures d'incubation en d'OGD, lors de l'expérience de mesure du transport qui s'effectue sur une cinétique de deux heures. Cependant aucune protection n'est observée sur la perméabilité des cellules endothéliales de la BHE.

L'ajout d'acide fénofibrique après quatre heures d'OGD ne montre pas d'effet protecteur sur la perméabilité endothéliale. Ceci suggère que l'acide fénofibrique protège la BHE en induisant des mécanismes préventifs de protection.

Afin d'identifier le mécanisme cellulaire impliqué dans la protection, nous avons tout d'abord effectué des traitements séparés des cellules gliales et des cellules endothéliales afin de savoir si le fénofibrate agit sur l'endothélium en le rendant résistant aux conditions d'OGD ou alors s'il modifie la réactivité des cellules gliales nécessaire à l'augmentation de la perméabilité. Pour cela une co-culture est prétraitée pendant 24h avec l'acide fénofibrique, avant d'être recombinaée avec une autre co-culture non traitée le jour de l'expérimentation afin de recréer deux nouvelles co-cultures: la première comporte uniquement des cellules endothéliales prétraitées, la seconde uniquement des cellules gliales prétraitées (figure 3A). Suite à l'incubation en OGD, l'augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales est réduite uniquement dans le cas où seules les cellules endothéliales avaient été prétraitées avec le composé (figure 3B). A l'issue de cette expérience, nous avons démontré que dans ces conditions, **l'acide fénofibrique cible exclusivement les cellules endothéliales** sans modifier la réactivité des cellules gliales.

Le fénofibrate est un agoniste du récepteur nucléaire PPAR- α . Dans le but de confirmer la cible moléculaire du fénofibrate dans les cellules endothéliales, nous avons développé un modèle de BHE utilisant des cellules endothéliales issues de souris dont le gène codant pour PPAR- α a été inactivé (PPAR- α knock-out), en co-culture avec des cellules gliales de phénotype sauvage. Les cellules endothéliales PPAR- α KO forment ainsi une monocouche de cellules exprimant le facteur de Von Willebrand ce qui valide leur phénotype endothélial. De plus, la localisation continue à la périphérie des cellules endothéliales de la claudine-5 valide la présence de jonctions serrées au niveau de la monocouche de cellules (figure 4).

Nous avons ensuite étudié la réponse des cellules PPAR- α KO au stress provoqué par l'OGD. Suite aux quatre heures d'incubation, nous avons mesuré une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales PPAR- α KO sans différence de réactivité par rapport au modèle sauvage (figure 5). De plus, l'augmentation de la perméabilité des cellules PPAR- α KO dépend également de la présence des cellules gliales.

Sur ce modèle, lorsque les traitements à l'acide fénofibrique sont appliqués, **aucun effet protecteur n'a été mesuré sur la perméabilité des cellules endothéliales PPAR- α KO** (figure

6A). De plus, la visualisation des jonctions serrées, par marquage immunocytochimique de la claudine-5, ne montre pas de rupture visible des jonctions intercellulaires dans l'ensemble des conditions expérimentales (figure 6B).

Cette expérience démontre la dépendance de l'activation de PPAR- α dans le phénomène de protection des cellules endothéliales de la BHE contre l'hyperperméabilité induite par les conditions d'OGD.

Conclusion

Grâce à l'utilisation du modèle *in vitro* murin de BHE développé pour l'étude de l'ischémie cérébrale, nous avons démontré que **l'acide fénofibrique exerce un l'effet protecteur en limitant l'hyperperméabilité de la BHE induite par l'OGD**. La réalisation de traitements séparés des cellules endothéliales et des cellules gliales a permis d'identifier les **cellules endothéliales comme cible cellulaire** de la protection. Nos conditions expérimentales mimant les conséquences immédiates de l'occlusion, les résultats obtenus mettent en évidence un **phénomène précoce de protection** sur la perméabilité de la BHE. L'effet protecteur se manifestant uniquement dans le cas de traitements préventifs suggère **l'induction d'un mécanisme de résistance** des cellules endothéliales. Ainsi la mise au point d'une culture de cellules endothéliales PPAR- α KO a permis une première approche dans l'identification des mécanismes moléculaires mettant en évidence **l'implication de l'activation de PPAR- α** dans la protection endothéliale.

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Activation Protects Brain Capillary Endothelial Cells from Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Hyperpermeability in the Blood-Brain Barrier

Caroline Mysiorek^{1,2,7}, Maxime Culot^{1,2,7}, Lucie Dehouck^{1,2,7}, Bruno Derudas^{1,3,4,5,7}, Bart Staels^{1,3,4,5,7}, Régis Bordet^{1,3,6,7}, Roméo Cecchelli^{1,2,7}, Laurence Fenart^{1,2,7} and Vincent Berezowski^{*,1,2,7}

¹Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

²UArtois, LBHE, EA 2465, F-62300, Lens, France

³UDSL, F-59000, Lille, France

⁴INSERM U545, F-59000, Lille, France

⁵IPL, Département d'Athérosclérose, F-59000, Lille, France

⁶CHULille, Département de Pharmacologie Médicale, EA 1046, F-59000, Lille, France

⁷IMPRT-IFR114, F-59000, Lille, France

Abstract: That promising neuroprotectants failed to demonstrate benefit against stroke highlights the great difficulties to translate preclinical pharmacological effects in clinical outcomes. Part of this hurdle implies the complex response to injury of the neurovascular unit increasing the cerebrovascular permeability at the level of the blood-brain barrier (BBB). Previous studies reported neuroprotection in animal models upon activation of the nuclear receptor PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor) α , but the cellular targets at the BBB level remain largely unexplored. Here, to study whether PPAR- α activation acts on BBB permeability, we adapted a mouse BBB cell model to ischaemic conditions at the stage of occlusion defined *in vitro* as oxygen-glucose deprivation (OGD). This model consists of a co-culture of brain capillary endothelial cells (ECs) on a filter insert placed upon a rat glial cell culture. The EC monolayer permeability increase induced by 4 h of OGD was significantly restricted after treatment with the PPAR- α agonist fenofibric acid (FA) 24 h before or at the onset of OGD. Treatments of separated ECs or glial cells showed that this protective effect was conferred by BBB ECs but not glial cells. Furthermore, co-cultures with ECs from PPAR- α -deficient mice revealed that FA had no effect on OGD-induced hyperpermeability. No transcriptional modulation of classical PPAR- α target genes such as SOD, ICAM-1, VCAM-1, ACO, CPT-1, PDK-4 or ET-1 was observed in wild type mouse ECs. In conclusion, these results suggest that part of the preventive PPAR- α -mediated protection may occur *via* BBB ECs by limiting hyperpermeability.

Keywords: Blood-Brain barrier, endothelium, *in vitro* model, ischaemia, neuroprotection, Peroxisome Proliferator-activated receptor-alpha.

INTRODUCTION

Ischaemic stroke is the third cause of death and the first cause of disability in the major industrialized countries after cardiovascular diseases and cancer (Hankey and Warlow 1999; Editorial 2005). However, combining a neuroprotective treatment with emergency care of patients who experience acute ischaemic stroke remains a clinical step which is

not considered even today. Actually, despite numerous promising drug candidates arising from preclinical studies, no neuroprotective molecule showed to date any clinical efficacy in the acute phase treatment of ischaemic stroke (Lee *et al.* 2000; Green 2008). Besides these agents capacity to target neurons, a reason put forward for this failure is the complexity of understanding the preclinically observed pharmacological effects on ischaemic injury as it implies cerebrovascular dysfunction at the level of the blood-brain barrier (BBB). Being affected by ischaemia itself, the BBB exhibits a very early impairment of its barrier function, *e.g.* a compromised permeability which can lead to disruption with ensuing appearance of brain vasogenic oedema (Betz *et al.* 1989). Oedema accelerates neuronal death thus worsens brain damage, and can even transform into an often fatal

*Address correspondence to this author at the Laboratoire de physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique (LBHE), Université Lille Nord de France, Université d'Artois, Faculté des Sciences Jean Perrin, rue Jean Souvraz, S.P.18, 62307 Lens cedex, France; Tel: +33(0)3 21 79 17 51; Fax: +33(0)3 21 79 17 36; E-mail: vincent.berezowski@univ-artois.fr

intracerebral haemorrhage in stroke patients (Ayata and Ropper 2002; Simard *et al.* 2007). Thereby, BBB permeability is considered as an exclusive criterion for thrombolytic therapy, the only medical intervention which consists in restoring blood flow by means of fibrinolytic agents such as rtPA (recombinant tissue-type plasminogen activator). Indeed, to keep a benefit / risk ratio in favour of this treatment, rtPA must be administered within the first three hours from the stroke onset, and only when the patient does not have oedema thus when the BBB is not disrupted yet, since the use of rtPA really improves clinical outcome of patients but also increases the risk of intracerebral haemorrhage (NINDS 1995, 1997). Thereby, and considering the organization of emergency care, only 5 % of stroke patients are eligible for this therapy.

Hence, besides research for new thrombolytic agents or neuroprotectants to treat ischaemic stroke in the acute phase, alternative therapeutic strategies are being developed intensely. An effective pharmacological treatment would consist in inducing resistance to the deleterious consequences of brain ischaemia prior to its occurrence (Chen and Simon 1997). A preventive neuroprotection approach is under study, subsequent to the observation of protective effects of hypolipemic drugs chronically given to patients with hypercholesterolemia, for whom stroke risk is higher (Amarenco 2001; Bloomfield Rubins *et al.* 2001). However, a recent experimental study reported *in vivo* that a preventive treatment with fenofibrate exerted a neuroprotective action independently of any effect on lipid metabolism (Deplanque *et al.* 2003). Known as a ligand of the nuclear receptor PPAR (Peroxisome-proliferator-activated receptor) α , this fibrate crosses the BBB at a very slow rate, suggesting its protective action would be localized at the vascular level. Studying this effect on permeability is a difficult task *in vivo* because of the technically challenging access to this interface amounting to an estimated total length of 650 km of capillaries embedded in brain parenchyma. The BBB is known as a dynamic barrier formed by brain capillary endothelial cells in close association with perivascular cells (Abbott *et al.* 2006; Zlokovic 2008). BBB characteristics, known to be induced by glial cells, were faithfully reproduced *in vitro* in a co-culture system of bovine brain capillary endothelial cells (ECs) on a filter insert placed upon a rat glial cells culture (Dehouck *et al.* 1990; Cecchelli *et al.* 1999). This model developed in our laboratory is not only used to predict the brain penetration of compounds, but also to study endothelial permeability as well as interactions between the BBB cellular components under physiological or pathological conditions (Brillault *et al.* 2002; Lundquist *et al.* 2002; Berezowski *et al.* 2004a; Culot *et al.* 2008). This original model was recently established from mouse to allow for a molecular approach to the physiopathological phenomena involving the BBB (Coisne *et al.* 2005; 2006). In the present study, this murine tool was first adapted to *in vitro* ischaemic conditions with the aim to assess the effect of a preventive fenofibrate treatment on the permeability of the BBB submitted to an ischaemic stress. The experimental use of this *in vitro* model was then intended for the determination of the BBB cell type targeted by fenofibrate. Next, this *in vitro* model was redesigned including cells from PPAR- α knock-out mice to confirm the molecular target of

this compound for BBB protection. Finally, the modulation of well known PPAR- α -dependent pathways was checked through the transcriptional expression analysis of seven selected target genes in wild type ECs.

MATERIALS AND METHODS

Mouse Brain Capillary Endothelial Cells (MBCECs)

All experiments were performed on cells extracted from wild type mice and PPAR- α -deficient (PPAR- α $-/-$) mice, both in C57Bl/6 genetic background, within the framework of the French legislation that controls animal experimentation (international permission number: A62-498-5). Wild type mice come from Janvier (Le genest-st-Isle, France). PPAR- α $-/-$ mice were from Pasteur Institute of Lille (N $^{\circ}$:A59-35009).

Mouse brain capillary endothelial cells (MBCECs) were isolated from brain cortices of 3-4 weeks mice as described by Coisne *et al.* (2005). Briefly, after removing the meninges and the outer vessels, cortices were homogenised in Hank's balanced salt solution (HBSS, containing 10mM HEPES and 0.1% BSA) using a Dounce homogenizer. The resulting homogenate was mixed with 30% dextran (v/v, molecular weight 100,000 - 200,000) in HBSS to discard the neural component. The pellet containing the vascular component was resuspended in HBSS and then filtered through a 59 μ m nylon mesh in order to retain larger vessels on the mesh surface while capillaries passed through. The resulting capillary-enriched fraction was digested with collagenase/dispase (2 mg/ml) (Roche Diagnostics, Meylan, France) for 33 min at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 μ g/ml DNase I (Roche Diagnostics, Meylan, France) and 0.147 μ g/ml Tosyl-lysine-chloromethyl-ketone (TLCK, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). After several washes, the resulting capillary suspension was seeded at 51000 digested capillaries/cm² onto matrigel-coated (BD Biosciences, Le pont de claix, France) TranswellTM polyester membrane inserts (pore size 0.4 μ m) obtained from Costar® (Corning incorporated, NY, NY, USA). The growing medium was DMEM supplemented with 20% Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA), 50X amino acids, 100X vitamins (Sigma Aldrich), 50 μ g/ml gentamycin, 2 mM glutamine and basic fibroblast growth factor (1 ng/ml).

Glial Cells

Primary glial cells cultures were prepared from C57Bl/6 wild type newborn mouse cerebral cortex. After removing the meninges, brain tissue was gently forced through a nylon sieve as described previously (Booher and Sensenbrenner 1972). Glial cells were plated on 12-well dishes coated with Poly-D-lysine hydrobromide (Sigma-Aldrich) at a concentration of 1.2 x 10⁵ cells /mL in 1.5 ml DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine and 50 μ g gentamycin. The medium was renewed twice a week. Three weeks after seeding, cultures of glial cells were stabilised and used for co-culture. Glial cells consist of astrocytes (84%), oligodendrocytes (10%) and microglial cells (6%) (Coisne *et al.* 2005).

Experimental Method for Co-Culture

Cultures of glial cells were prepared as described above. After 3 weeks, 24 h-seeded MBCEC monolayer inserts were set in 12-well culture plates containing glial cells. This co-culture system closely mimics the *in vivo* situation, as the insert compartment containing MBCECs (luminal compartment) corresponds to the blood side, and the well of the culture plate containing glial cells (abluminal compartment) corresponds to the brain side. The medium was the same as that for MBCECs. The medium was renewed every day until the day of experiment. Under these conditions, MBCECs migrated from digested capillaries and reached confluence about 4 days after plating. The confluence of MBCEC monolayer was checked from 2 days after plating by bright-field microscopic visualization from a 12-well culture dish seeded as a control for growth. Experiments were carried out 4 days after setting up the co-culture.

Oxygen Glucose Deprivation Studies

Experiments were performed 24 h after the last medium renewal, to avoid slight hypoglycaemic condition due to culture as observed with the bovine model (Brillault *et al.* 2002). To simulate ischaemia-like conditions *in vitro*, co-cultures were subjected to oxygen glucose deprivation (OGD) as described by Brillault *et al.* (2002) with slight modification. Briefly, the day of experiment, co-culture were exposed to OGD condition by adding a glucose- and serum-free medium equilibrated with nitrogen (OGD medium). Co-cultures were placed for defined time in a 37°C incubator at 0% O₂, 5% CO₂, 95% N₂ using GasPack EZ bags (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). For experiments, serum-free medium was used to avoid temporary permeability-increasing artifacts due to serum growth factor and to allow short studies. For normoxic controls, the serum free-medium was equilibrated with air and contained glucose (1 g/L). In all experiments, the pH of the medium was unchanged during normoxic or OGD conditions. Permeability studies under OGD condition were performed under an airtight glove box (Forma Scientific, Mountain View, CA, USA) which reproduces an anaerobic atmosphere, checked for a maximal O₂ rate of 0.1%, monitored using an oxymeter probe (GOX 100, Greisinger electronic GmbH, Germany).

Fenofibrate Treatment

To reproduce *in vitro* a prophylactic *in vivo* treatment with fenofibrate known to be rapidly and completely metabolized to fenofibric acid (FA), its major active metabolite, by plasma and tissue esterases, co-cultures were incubated with FA (Laboratoire Fournier, Dijon, France) after direct solubilization in culture medium to the corresponding concentration ranging from 1 to 200 μM. To assess the protective effect of a pretreatment with FA, the compound was added to the culture medium 24 h before experiment, in the luminal compartment to simulate blood supply. A treatment at the onset of OGD consisted in adding FA luminally to the OGD medium at the beginning of the 4 h OGD time period. To simulate *in vitro* an acute phase treatment of ischaemia, FA was added luminally to the corresponding buffer for the LY transendothelial permeability study performed during the 2 h time following the 4h-OGD period.

To determine the cellular target of FA, treatments were assessed on MBCECs and glial cells separately after co-culture. In the pretreatment procedure, FA was added in the luminal compartment to treat MBCECs and glial cells. Before OGD incubation, MBCECs and glial cells treated with FA were separated to piece together a second co-culture with respectively glial cells and MBCECs which had never been in contact with FA.

Transendothelial Permeability Studies

To evaluate the transendothelial permeability, 50 μM Lucifer Yellow (Lucifer Yellow CH dilithium (LY), Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), a fluorescent marker of endothelial monolayer integrity, was used. During the permeability study, ECs monolayer inserts were transferred to 12-well plates containing 1.5 mL Ringer-HEPES solution (150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 0.2 MgCl₂, 6 mM NaHCO₃, 2.8 mM glucose, 5 mM HEPES) per well (abluminal compartment). The medium was removed and replaced with 0.5 mL of Ringer-HEPES containing LY at 50 μM and FA at a 100 μM concentration in case of acute administration of FA, in the luminal compartment. At 30, 60, 90 and 120 min, inserts were transferred to other wells containing 1.5 mL of Ringer-HEPES, to minimize an eventual flux of compound from the abluminal to the luminal compartment. For each condition, three inserts were used. Quantification of fluorescence was performed with an aliquot of 200 μl withdraw from each abluminal compartment at each time and 20 μl of luminal compartment and initial solution (Fluoroskan Ascent FL Thermolabsystems). The endothelial permeability coefficient (P_e) was calculated in centimetres per minute as described previously (Dehouck *et al.* 1992), after HPLC separation (Phenomenex Synergi RP-MAX 80Å, 150 x 3 mm, 4 μm) and UV detection (280 nm) for FA. To obtain a concentration-independent transport parameter, the clearance principle was used. The slopes of the clearance curves for the cultured insert and the control filters were PS_i and PS_f , respectively, with PS = permeability x surface area product. Permeability of endothelial cells monolayers (PS_e) was calculated according to the formula: $1/PS_e = 1/PS_i - 1/PS_f$. The permeability coefficient of endothelial cells (P_e) was obtained by dividing PS_e value by the surface area of the insert (1 cm² for a 12-well Transwell™ filter). For OGD studies, Ringer-HEPES without glucose and equilibrated with nitrogen was used, and the permeability assay of LY was performed under airtight glove box filled with nitrogen at 37°C.

Fluorescent Microscopy

The following specific primary antibodies were used: Rabbit anti-human von Willebrand factor from Dako (Dakocytomation S.A., Trappes, France) and Rabbit anti-human claudin-5 from Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA).

Claudin-5 and Von Willebrand Factor Staining

After measurement of BBB permeability, immunofluorescent staining was performed on filters with MBCECs fixed for 1 minute with cold methanol/acetone (v/v). Non specific binding was blocked by a preincubation with 10% normal

goat serum (NGS) in phosphate buffered saline calcium and magnesium free (PBS) for 30 minutes. Primary antibody, against claudin-5 and Von Willebrand factor, were added (1/200 dilution in 2% NGS in PBS) for 60 min at room temperature. After 3 washes with PBS supplemented with 2% NGS, the secondary antibody (Alexafluor-488, Molecular Probe, Eugene, OR, USA) was reacted for 30 minutes (1/200 dilution in 2% NGS in PBS). After several washes with 2% NGS in PBS, nuclei were stained using Hoechst reagent (Bis benzimide, Sigma-Aldrich). Filters were mounted on slide with Mowiol (Sigma-aldrich) containing DABCO (Sigma-Aldrich) as anti-quenching agent.

Visualization

Fluorescence was visualized with a Leica DMR fluorescent microscope. Images were collected using Cool SNAP RS Photometrics camera (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), processed and merged using Adobe Photoshop software (Adobe System, San Jose, CA, USA).

RNA Analysis

Total RNA was extracted using QIAGEN (Valencia, CA) RNA extraction kits following manufacturer's instructions. Total RNA was treated with deoxyribonuclease I (Ambion Inc., Austin, TX) at 37°C for 30 min, followed by inactivation at 75°C for 5 min. Real-time quantitative PCR (RT-QPCR) assays were performed using MX3000P (Stratagene). Total RNA (1µg) was reverse transcribed with random hexamers using a High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's protocol. Gene expression levels were

determined by Brilliant II SYBR Green QPCR master mix. Cyclophilin transcript was used as an internal control to normalize the variations for RNA amounts. Gene expression levels are expressed relative to Cyclophilin mRNA levels. All the presented results are expressed as mean ± SEM. All the primers used in this study and cycle threshold are displayed in Table 1.

RESULTS

Permeability Increase of the Mouse BBB ECs in Response to OGD

To simulate the pathological condition of ischaemia, the co-culture was exposed to an oxygen and glucose-deprived environment as described by Brillault *et al.* (2002) adapted to the syngenic murine BBB *in vitro* model. These experimental conditions are close to the pathological situation in which both glucose and oxygen levels dramatically decrease following occlusion. These first hour-events are known to have an effect on BBB permeability. In this study, a 4 h-incubation under OGD conditions was necessary to observe a 288% significant increase in EC permeability compared with normoxic control, after measurement of the transendothelial permeability to Lucifer Yellow (LY), a fluorescent weak-permeant molecule used as a BBB integrity marker (Fig. 1). Such an OGD-induced hyperpermeability is known to depend on the presence of glial cells, as described in a previous study (Brillault *et al.* 2002). This dependence on glial cells was confirmed in the murine model, since no significant increase in permeability of the EC monolayer was obtained when exposed to 4 h of OGD without glial cells.

Table 1. DNA Primers Used for Analysis of Selected PPAR-α Target Genes

Target	Accession nb	F/R	Sequence	Ct	Amplification (bp)
ET-1	NM_010104	F	5' TTC TTC CAG GTC CAA GCG TTC 3'	21.87	221
		R	5' GTA GTT TCC TTC CTT CCA CCA GC 3'		
CpT-1	NM_013495	F	5' CAT CAT GAC TAT GCG CTA CTC 3'	25.35	261
		R	5' CAG TGC TGT CAT GCG TTG G 3'		
ACO	NM_015729	F	5' ACA TCT TGG ATG GTA GTC CG 3'	23.15	114
		R	5' TAA CGC TGG CTT CGA GTG AG 3'		
VCAM-1	NM_011693	F	5' TCT CCA GCT TCT CTC AGG AAA TGC C 3'	24.99	195
		R	5' AAC CGA ATC CCC AAC TTG TGC AG 3'		
ICAM-1	NM_010493	F	5' ACC CCA AGG AGA TCA CAT TCA CGG 3'	22.91	127
		R	5' CCT GGC CTC GGA GAC ATT AGA GAA C 3'		
PDK-4	NM_013743	F	5' TTT CCA GGC CAA CCA ATC C 3'	26.84	115
		R	5' GAA GGA CGG TTT TCT TGA TGC TCG T 3'		
SOD-1	NM_011434	F	5' ACC AGT GCA GGA CCT CAT TTT TAA 3'	27.84	76
		R	5' TCT CCA ACA TGC CTC TCT TCA TC 3'		
cyclophilin	NM_008907	F	5' GCA TAC GGG TCC TGG CAT CTT GTC C 3'	18.15	200
		R	5' ATG GTG ATC TTC TTG CTG GTC TTG C 3'		

From left to right: *Mus musculus* cDNA targeted for amplification, accession number of cDNA from NCBI database, Forward (F), Reverse (R) primer designation, 5' to 3' sequence, crossing point (Ct) and size in bp of the amplified cDNA band.

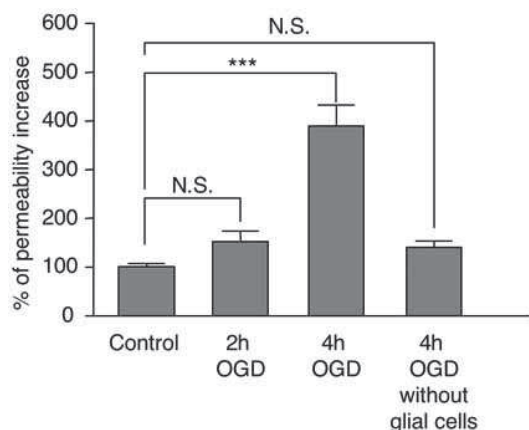


Fig. (1). BBB EC hyperpermeability to LY following OGD.

EC monolayer permeability increase to LY after 2 or 4 h of OGD with or without glial cells. Results are presented as mean percentage \pm SEM. The 100% control value represents a P_e of 0.27×10^{-3} cm/min for LY after 4 h under normoxic conditions. The mean scores were significant using one-way ANOVA. *** $p < 0.001$ versus control ($n = 12$ EC monolayers/treatment, Bonferroni test) N.S.: Non significant.

FA Protects the BBB *In Vitro* from OGD-Induced Hyperpermeability

To study the protective effect of a prophylactic treatment (pretreatment) with fenofibrate on the BBB, the co-culture was incubated with its active metabolite, fenofibric acid (FA), on the 4th day of culture e.g. 24 h before the onset of OGD or at the onset of OGD for 4 hours. The compound was added to the culture medium in the luminal compartment of the co-culture system to simulate blood supply. Following an incubation of the cells with FA for 24 h before the onset of OGD, the increase in permeability induced by the 4 h-OGD was significantly restricted at 100 μ M and 200 μ M as shown in Fig. (2A). The compound action was secondly tested when added to the medium at the onset of OGD e.g. for 4 h, and at the same concentrations. A significant restriction of the EC permeability increase was obtained at 50 μ M and 100 μ M of FA. A supplemental treatment performed at the onset of OGD on pretreated ECs had no additional effect on the observed protection, suggesting that FA may act through the same mechanisms under normoxia or at the onset of OGD (Fig. 2B). No statistical difference was noticed in the magnitude of FA protective effect upon 4 h-treatment when compared with the 24 h-pretreatment. To verify that FA had no direct effect on ECs baseline permeability, transendothelial permeability to LY was measured in normoxic control cells after incubation with the compound for 4 or 24 h, and revealed no significant change (Fig. 2B). These results show that a 24 h-pretreatment or a treatment with FA at the onset of OGD protects the BBB *in vitro* by limiting to the same extent the OGD-induced increase in permeability. The OGD stress did not induce any visible rupture of the EC monolayer as suggested by the still continuous reticular localisation of tight junction associated protein claudin-5 at the cell borders, suggesting that cells were sealed together in control and OGD experimental conditions (Fig. 2C).

Targeting of ECs for *in vitro* BBB Protection

To specify the cell type targeted by FA at the BBB, the co-culture of ECs and glial cells was incubated with the compound 24 h before the onset of OGD, split and then recombined at the beginning of the experiment in co-culture with respectively glial cells and ECs which had never been in contact with the compound (Fig. 3A). A luminal supply of 100 μ M FA exposes glial cells to a concentration of 25 μ M, as measured in the abluminal compartment of our model 24 h after FA addition (data not shown). When only the ECs were treated with FA, the OGD-induced increase in permeability was significantly restricted by 70% (Fig. 3B). In contrast, an exclusive pretreatment of glial cells did not induce any significant variation in the increase in permeability.

Next, to simulate an acute phase treatment of ischaemia, the endothelial protective effect of FA was assessed after the onset of OGD, when the EC monolayer was already hyperpermeable. This treatment consisted in adding FA to the luminal compartment of the co-culture system for the 2 h time following the OGD period and during which the permeability of the endothelial monolayer to LY is measured. No significant restriction of the OGD-induced permeability increase was observed, compared with the control without FA (data not shown). In this experiment, as for LY, FA crossed the ECs at very slow rate under normoxia and at a much higher rate under OGD, as shown by the P_e mean values of $0.64 \pm 0.09 \times 10^{-3}$ cm/min and $6.45 \pm 2.28 \times 10^{-3}$ cm/min respectively (data not shown).

These results highlight that the protective effect of a preventive FA treatment targets the BBB ECs exclusively. A FA treatment after the onset of OGD is not able to protect the ECs from hyperpermeability, but allows an increased diffusion of FA across the EC monolayer.

BBB ECs Protection Against OGD is Dependent on PPAR- α

In order to validate the molecular target of fenofibrate for the protection of BBB ECs, the *in vitro* BBB model was redesigned using MBCECs isolated from PPAR- α -deficient mice (PPAR- α -/-), as FA is a known ligand of this nuclear receptor. As for wild type mice, the MBCECs isolation procedure from PPAR- α -deficient mice allowed the identification, after co-culture with wild type glial cells, of a BBB *in vitro* model displaying the same barrier properties as described by Coisne *et al.* (2005). In both co-cultures, a microscopic analysis of MBCECs culture morphology showed a confluent monolayer of non-overlapping ECs (Fig. 4). Immunostaining of von Willebrand factor confirmed the endothelial phenotype of MBCECs, while the marginal localization at the cell border of a continuous network of labelled tight junction-integral protein claudin-5 suggested the tightness of the barrier. This suggested tightness was then validated through a low endothelial permeability to LY revealed by the determined P_e value as a mean of $0.39 \pm 0.08 \times 10^{-3}$ cm/min for wild type MBCECs monolayer, and $0.38 \pm 0.05 \times 10^{-3}$ cm/min for PPAR- α -/- . Similarly, a series of permeability experiments was performed using [¹⁴C]sucrose, a radiolabelled weak-permeant molecule which is widely

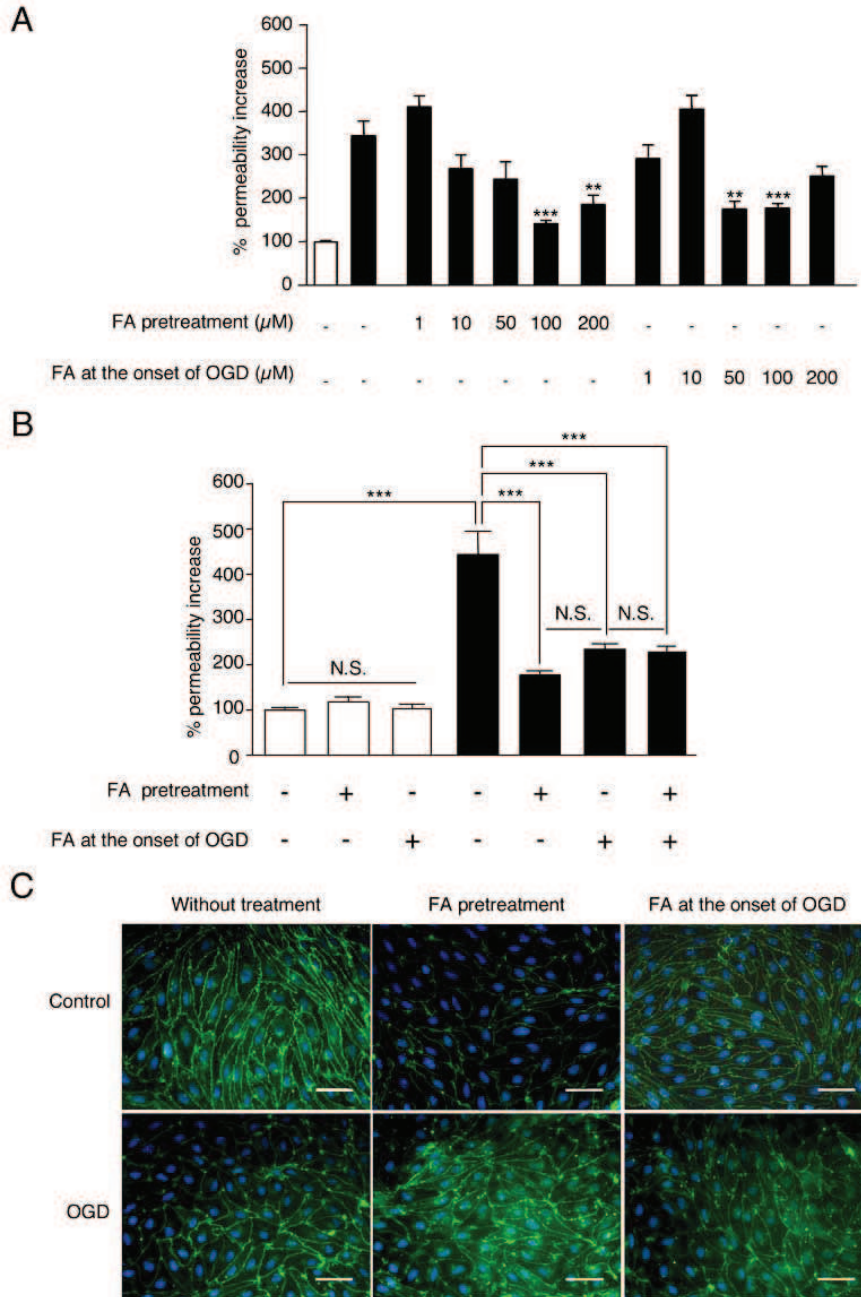


Fig. (2). Restricted BBB EC hyperpermeability to LY after OGD upon FA treatment.

(A). Dose-response study. EC monolayer permeability increase to LY after 4h of OGD (filled bars) or 4 h of normoxic conditions (open bars), with or without 1μM, 10μM, 50μM, 100μM or 200μM of fenofibric acid 24h before or at the onset. Results are presented as mean percentage ± SEM. The 100% control value represents a P_e of 0.26×10^{-3} cm/min for LY after 4 h under normoxic conditions. The mean scores were significant using one-way ANOVA. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ versus OGD (n = 6 EC monolayers/treatment, Bonferroni test) N.S.: Non significant. **(B). Time-response study.** EC monolayer permeability increase to LY after 4 h of OGD (filled bars) or 4 h of normoxic conditions (open bars), with or without 100 μM FA treatment 24 h before or/and at the onset. Results are presented as mean percentage ± SEM. The 100% control value represents a P_e of 0.30×10^{-3} cm/min for LY after 4 h under normoxic conditions. The mean scores were significant using one-way ANOVA. *** $p < 0.001$ (n = 12 EC monolayers/treatment, Bonferroni test). FA: fenofibric acid; N.S.: Non significant. **(C) Immunostaining of tight junction protein claudin-5 in ECs.** Localization of claudin-5 protein under control and 4h OGD with or without fenofibric acid treatment. (bar = 50μm).

reported as a BBB integrity marker, and demonstrated as well a low permeability to this marker (Mean $P_e = 0.31 \pm$

0.03×10^{-3} cm/min for wild type MBCECs, and $0.30 \pm 0.06 \times 10^{-3}$ cm/min for PPAR-α^{-/-}, data not shown). Transen-

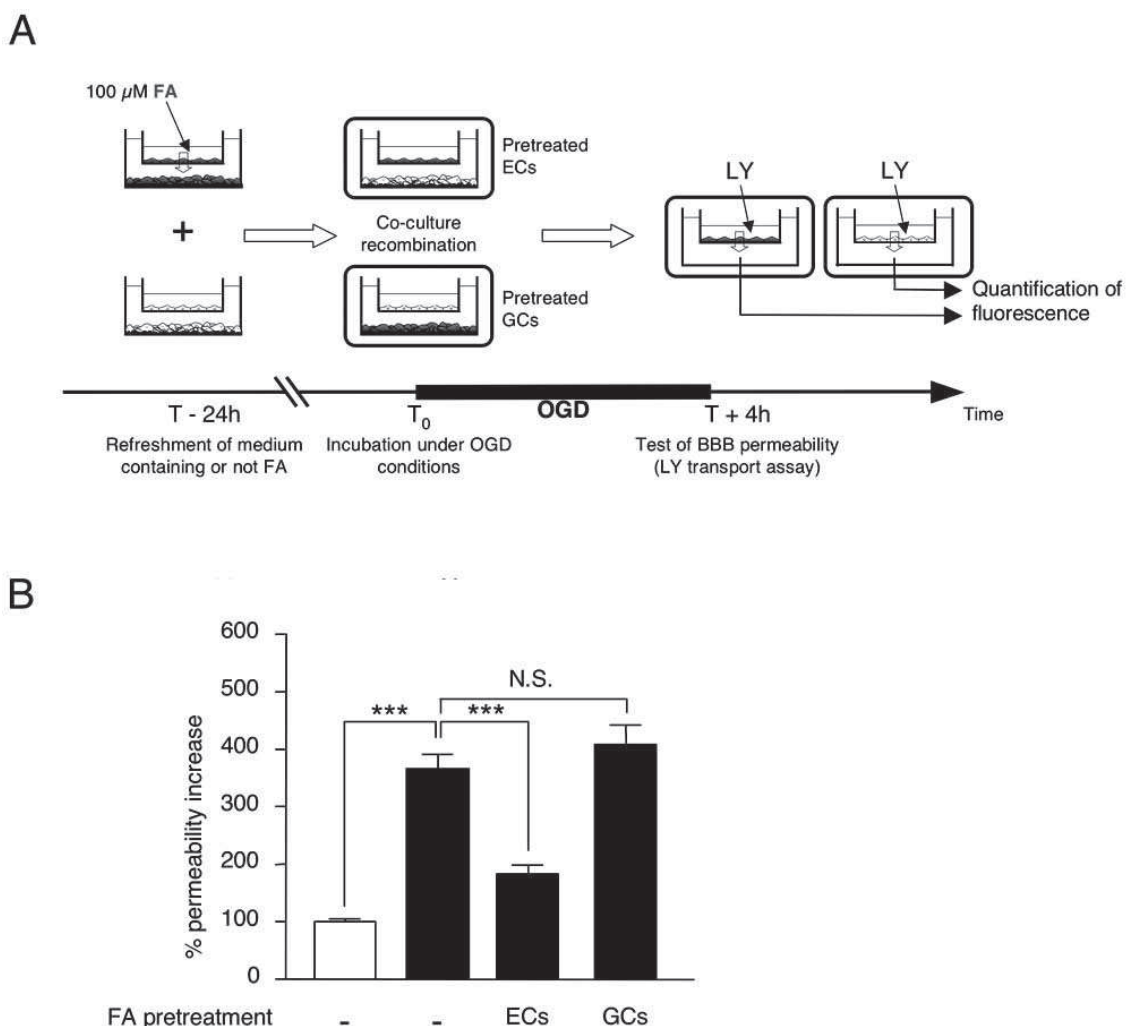


Fig. (3). FA targeting of BBB ECs for restriction of hyperpermeability to LY under OGD.

(A) Schematic diagram of experimental protocol for pretreatment with FA of ECs or glial cells separately. Grey cells are treated with FA. White cells are untreated. ECs: endothelial cells; GCs: glial cells; FA: fenofibric acid; T: Time; LY: Lucifer yellow. (B) Effect of FA separate treatment of ECs and GCs. EC monolayer permeability increase to LY after 4 h of OGD (filled bars) or 4 h of normoxic conditions (open bars), with or without FA treatment of endothelial cells (ECs) or glial cells (GCs) 24 h before the onset of OGD. Results are presented as mean percentage ± SEM. The 100% control value represents a P_e of 0.33 x 10⁻³ cm/min for LY after 4 h under normoxic conditions. The mean scores were significant using one-way ANOVA. ***p < 0.001; (n = 12 EC monolayers/treatment, Bonferroni test). FA: fenofibric acid. N.S.: Non significant.

dothelial permeability of LY and [¹⁴C]sucrose was assessed in parallel in the bovine BBB *in vitro* model which is widely used for toxicological screening (Cecchelli *et al.* 1999; Culot *et al.* 2008), and revealed the same range of low permeability to both integrity markers as mean P_e = 0.39 ± 0.06 x 10⁻³ cm/min for LY and P_e = 0.40 ± 0.07 x 10⁻³ cm/min for [¹⁴C]sucrose (data not shown). This range of P_e values for such integrity markers, since below 1 x 10⁻³ cm/min, is reported in our co-culture models as relevant to a validated BBB tightness in terms of *in vitro* / *in vivo* correlations (Lundquist *et al.* 2002; Culot *et al.* 2008).

The response of the PPAR-α -/- ECs to our *in vitro* ischaemic conditions was then tested. The co-culture with PPAR-α -/- ECs was submitted to the same OGD experi-

mental procedure, and 4 h also were necessary to obtain an increase in permeability (Fig. 5) of comparable magnitude as that for the co-culture with wild type ECs (Fig. 1). The same FA pretreatment and treatment at the onset of OGD were applied to the co-culture with PPAR-α -/- ECs, and none of them had a significant effect on the OGD-induced endothelial hyperpermeability (Fig. 6A). As not observed on the PPAR-α -/- ECs, the protective effect of FA exerted on the wild type ECs thus acted through activation of PPAR-α. The OGD stress did not induce any visible rupture of the PPAR-α -/- EC monolayer as suggested by the still continuous reticular localisation of tight junction associated protein claudin-5 at the cell borders, suggesting that cells were sealed together in control and OGD experimental conditions (Fig. 6B).

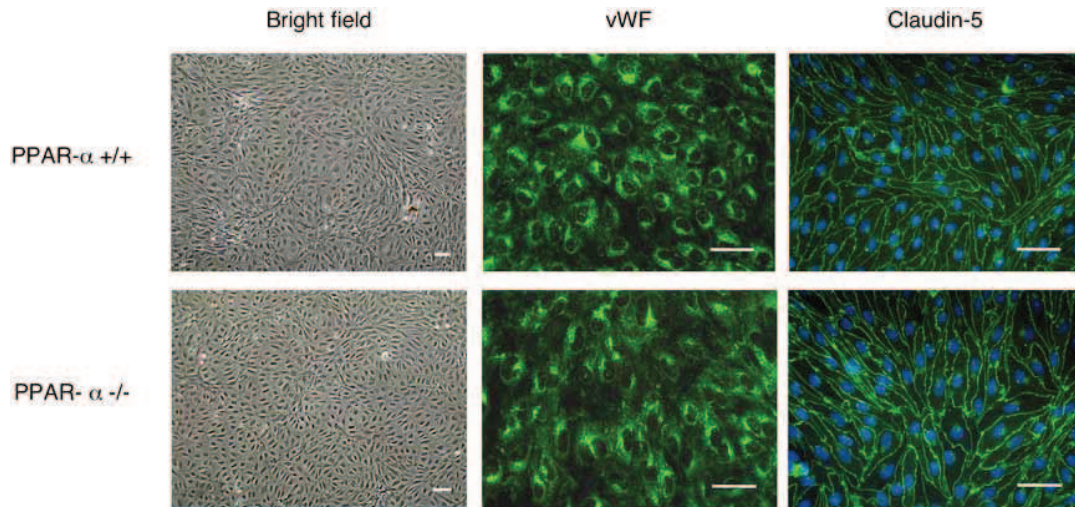


Fig. (4). Morphology and endothelial barrier phenotype of the wild type and PPAR- α $-/-$ EC cultures by microscopic examination and immunocytochemistry of Von Willebrand factor and claudin-5.

Bright field micrograph of confluent MBCECs co-cultured with glial cells (bar = 50 μ m), immunostaining of perinuclear dotted localization of Von Willebrand factor (vWF) in MBCECs, and immunostaining of tight junction-associated protein claudin-5 (bar = 25 μ m) for PPAR- α and PPAR- α MBCECs.

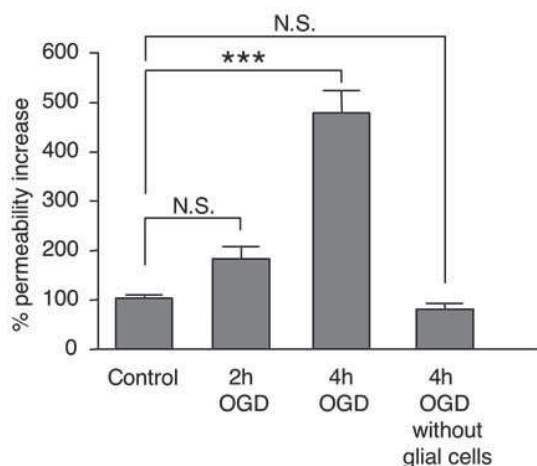


Fig. (5). PPAR- α $-/-$ EC hyperpermeability to LY following OGD.

PPAR- α $-/-$ EC monolayer permeability increase to LY after 2 or 4 h of OGD with or without glial cells. Results are presented as mean percentage \pm SEM. The 100% control value represents a P_c of 0.35×10^{-3} cm/min for LY after 4 h under normoxic conditions. The mean scores were significant using one-way ANOVA. *** $p < 0.001$ versus control (n = 12 EC monolayers/treatment, Bonferroni test), N.S.: Non significant.

Reported PPAR- α Target Genes are Not Regulated in FA-Treated BBB ECs

As PPAR- α activation is found necessary for protection in our model, the transcriptional expression of seven well known target genes (Inoue *et al.* 2001; Deplanque *et al.* 2003; Liu *et al.* 2003; Aasum *et al.* 2008) was analyzed in our ECs using RT-QPCR assays to check for modulation of oxidative stress, inflammation, lipid or carbohydrate meta-

bolism pathways. Neither Cu/Zn superoxide dismutase (SOD), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), nor acyl CoA oxidase (ACO), carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1), pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK-4) or Endothelin-1 (ET-1) showed any change in mRNA levels upon 4 h or 24 h FA treatment (Fig. 7).

DISCUSSION

The *in vitro* model of the BBB, generated by growing bovine brain capillary ECs above rat glial cells, has already proved valuable in a series of studies of permeability (Dehouck *et al.* 1990; 1992; Cecchelli *et al.* 1999; 2007; Culot *et al.* 2008), transport functions of brain endothelium (Dehouck *et al.* 1994; Descamps *et al.* 1996; Berezowski *et al.* 2004b; Benchenane *et al.* 2005b), and responses to pathological situations (Plateel *et al.* 1995; 1997; Brillault *et al.* 2002; Benchenane *et al.* 2005a; Lopez-Atalaya *et al.* 2007). To allow for a molecular approach to pathophysiological phenomena involving the BBB, a mouse syngenic model was developed in our laboratory and reported first as a tool to examine inflammatory events at the BBB level (Coisne *et al.* 2005; 2006). Here we report for the first time the adaptation of this murine model to the investigation of protective effect of PPAR- α activation on BBB permeability under ischaemic conditions, and to the determination of the BBB cellular and molecular targets of FA. The observed increase of BBB permeability in our model following 4 h of OGD without visible rupture of the EC monolayer is consistent with an early BBB dysfunction consequently to ischaemic occlusion (Gasche and Copin 2003; Fagan *et al.* 2004). This does not exclude any potential modulation of endothelial barrier functionality occurring without breakdown of the EC monolayer. Moreover, no endothelial hyperpermeability was detected when glial cells were absent

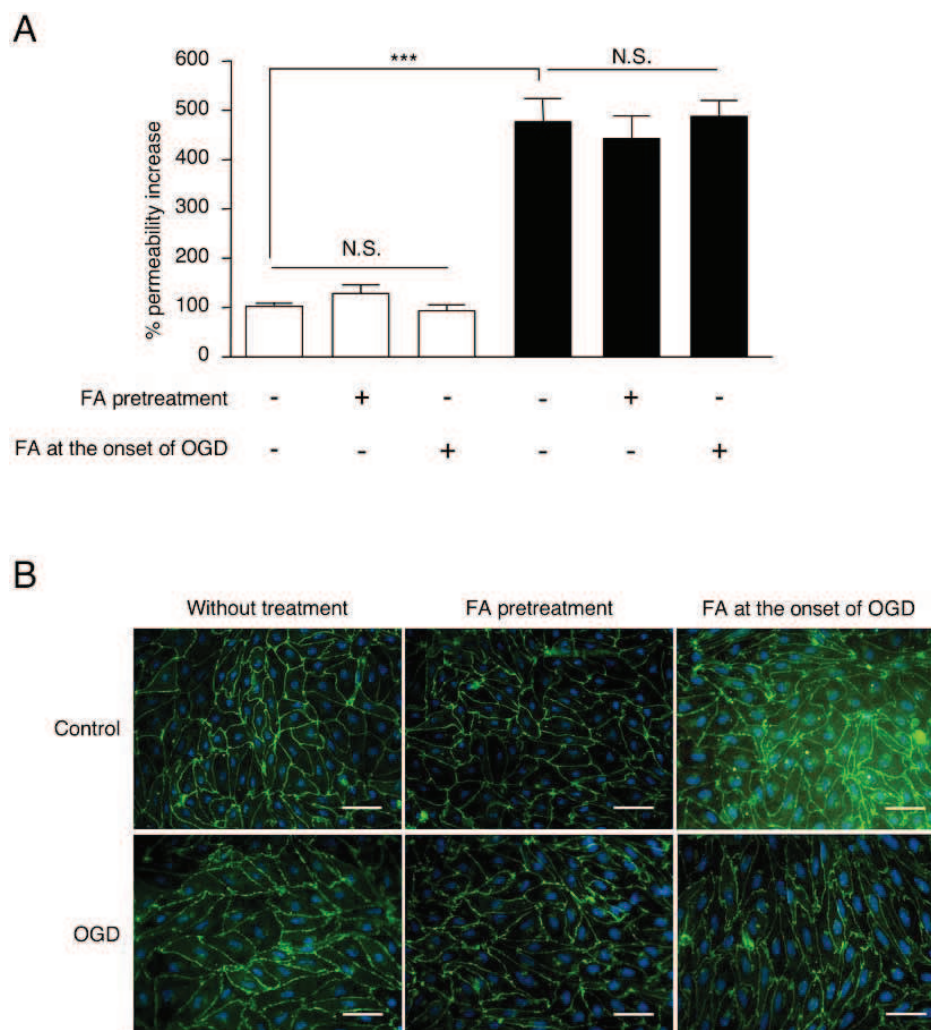


Fig. (6). Absence of restricted PPAR- α -/- EC hyperpermeability to LY after OGD upon FA treatment.

(A) PPAR- α -/- EC monolayer permeability increase to LY after 4h of OGD (filled bars) or 4 h of normoxic conditions (open bars), with or without 100 μ M FA treatment 24 h before or at the onset. Results are presented as mean percentage \pm SEM. The 100% control value represents a P_c of 0.37×10^{-3} cm/min for LY after 4 h under normoxic conditions. The mean scores were significant using one-way ANOVA. *** $p < 0.001$ versus control (n = 12 EC monolayers/treatment, Bonferroni test). FA: fenofibric acid; N.S.: Non significant. (B) Immunostaining of tight junction protein claudin-5 in ECs. Localization of claudin-5 protein under control and 4h OGD with or without fenofibric acid treatment. (bar = 50 μ m).

during OGD, which confirms the reported importance of glial input for the response of brain ECs following a pathological insult (Brillault *et al.* 2002).

The protective effect of a FA preventive treatment appeared in our BBB *in vitro* model through a limited hyperpermeability of the EC monolayer under OGD. From the dose-response experiment, as 100 μ M of FA induces the maximal and reproducible responses in both treatments, and moreover represents only 4 times the EC_{50} of FA in the mouse (Kuwabara *et al.* 2004), this concentration was further used for the next experiments. In addition, this 100 μ M concentration is equal to the dose of FA quantified (data not shown) in the plasma of fenofibrate-treated rats obtained from a previous study (Deplanque *et al.* 2003). In our experimental pretreatments, incubation of the co-culture in

the presence of FA is stopped at the beginning of OGD which is thus held in absence of this drug. The protection noticed here suggests that FA may initiate mechanisms within the BBB which render it resistant to OGD. This outcome puts forward that this drug may partly act for an upstream restriction of vasogenic oedema *in vivo* as this complication is known to be promoted by an early increase in vascular permeability (Betz *et al.* 1989; Simard *et al.* 2007). This hypothesis for protection targeting the BBB was first raised in a previous study ensuing the slow rate at which FA crossed this barrier *in vitro* on the bovine model (Deplanque *et al.* 2003). Thus, this FA-mediated protection of the BBB observed *in vitro* may provide a partial explanation for the protection observed *in vivo* through a reduced cortical infarct volume in fenofibrate-treated mice subjected to a transient middle cerebral artery occlusion

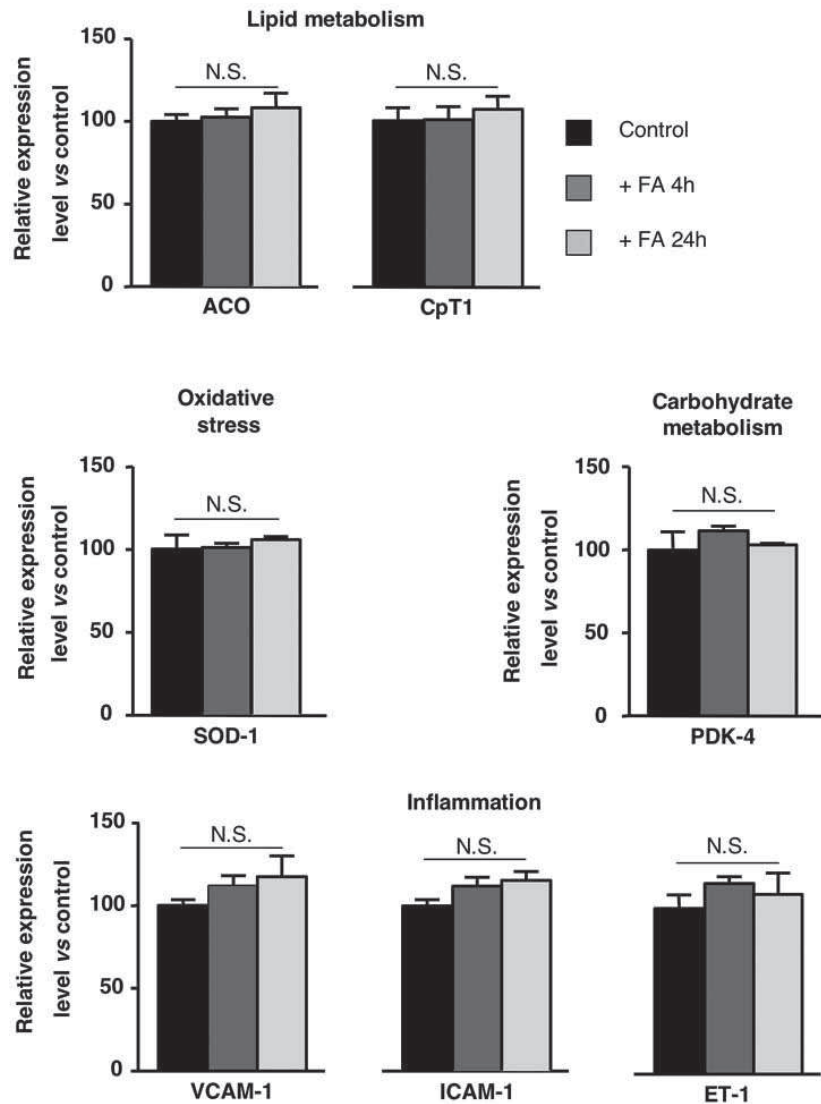


Fig. (7). Regulation of the transcriptional expression by RT-QPCR analysis of selected PPAR- α target genes in ECs.

Real-time quantitative PCR analysis of ACO, CPT1, SOD, PDK4, VCAM-1, ICAM-1, ET-1 and cyclophilin were performed on total RNA isolated from ECs preventively treated or not with fenofibric acid (FA) for 4h or 24 h under normoxic conditions. mRNA levels were normalized to cyclophilin mRNA and are expressed relative to the levels in untreated cells set as 100%. Results are expressed as mean percentage \pm SEM. Statistical analysis were performed using One-way ANOVA ($n = 9$ EC monolayers/treatment, Bonferroni test). N.S.: Non significant.

(Deplanque *et al.* 2003; Inoue *et al.* 2003). However, as this *in vivo* model of ischaemic stroke from Deplanque *et al.* comprises reperfusion, this vascular hypothesis for fenofibrate-induced neuroprotection was also supported following observation of a down-regulation of adhesion proteins expression such as VCAM-1 and ICAM-1 24 h after reperfusion. Such a reduced expression of these adhesion molecules suggested that fenofibrate might neutralize the late inflammatory processes through a prevention of infiltration of the brain ischaemic area by polynuclear neutrophils which are known to contribute to the extension of ischaemic lesions (Huang *et al.* 2006). As our OGD conditions emulate the immediate consequences of ischaemic occlusion, our study brings for the first time evidence of an *in vitro* protective

effect of FA on BBB EC hyperpermeability in the early time of ischaemia.

In our experiments, FA acted rapidly on ECs since a short exposure at the onset of OGD has led to a protective effect on EC integrity comparable to the one obtained after a 24 h pretreatment. However, an acute phase treatment was simulated on already hyperpermeable EC monolayer, and did not proved any protective effect. These results suggest that the action of FA is effective only when ECs are intact as exposure to the compound is thus optimized, in contrast to when the EC monolayer is permeable, the compound is crossing this impaired tissue and thus limits exposure. In both cases, and supported by FA P_e increase under OGD, this drug may also reach the brain parenchyma *in vivo* and elicit

protection on nervous cells as reported for the three PPAR subtypes (Bordet *et al.* 2006; Culman *et al.* 2007; Iwashita *et al.* 2007). The protective action observed here would rather consist in inducing or supporting defence mechanisms than thwarting deleterious processes which are already triggered. Our observations may be in agreement with the concept of preventive neuroprotection, but through a vascular protection based on experimental concept of brain ischaemic tolerance in which cerebral resistance against ischaemia consequences is induced prior to its occurrence (Chen and Simon 1997; Obrenovitch 2008). Taken together, our results may illustrate a pharmacological induction of yet unknown biological mechanisms observed in ischaemic tolerance, as reported with other substances (Jonas 1995; Savitz and Fisher 2007).

A separated treatment of ECs and glial cells with FA revealed an exclusive action on ECs which appear to be the target, but not for a regulation of their normal barrier function since no change was observed in the baseline permeability to a typical marker molecule when the fibrate was present during normoxic control experiments. Fibrates being previously reported to exert their pleiotropic pharmacological effects by activating PPAR- α (Fruchart *et al.* 1999; Bordet *et al.* 2006; Staels 2007), we hypothesized that the FA protection of ECs was the result of this nuclear receptor activation. The involvement of PPAR- α in the BBB EC protection was thus tested using MBCECs isolated from PPAR- α -deficient mice. These ECs were cultured on a filter insert in the presence of glial cells from wild type (PPAR- α +/+) mice in order to allow for a comparison of the effect of FA on the permeability of both types of MBCECs previously cultured in an identical glial environment during the establishment of the BBB properties *in vitro*, and for experiments under normoxic or ischaemic conditions. Although from genetically modified mouse origin, PPAR- α -deficient MBCECs formed a confluent cell monolayer displaying identical morphology and baseline permeability to those of wild type MBCECs. In the same way, the response of PPAR- α -deficient ECs to OGD generated a hyperpermeability of comparable intensity with that of PPAR- α +/+ ECs. Such a similarity of the responses to OGD of both types of MBCECs enabled us to evaluate and compare the effect of FA on the EC permeability under our experimental conditions. No effect on the PPAR- α -deficient EC hyperpermeability was observed after a 24 h pretreatment or treatment at the onset of OGD. This result strongly argues in favour of PPAR- α activation as a mechanism of the protective effect of FA on BBB ECs, and is in accordance with the absence of protection observed *in vivo* in PPAR- α -deficient mice (Deplanque *et al.* 2003). Furthermore, as well known PPAR- α target genes such as ICAM-1, VCAM-1, or ACO, CPT-1, ET-1, SOD-1 or even PDK-4 are not regulated in our BBB *in vitro* model after FA treatment, the protection observed in our *in vitro* model may occur through a complex coordination of these pathways with perhaps unexpected mechanisms modulated at this early time of the ischaemic event when occlusion just occurred.

The mechanisms of the early opening of the ischemic BBB being currently unclear, our results propose that FA may protect the BBB ECs also by modulating original pathways which would prevent these cells from becoming

permeable in the early phase of ischaemia. Identifying these pathways requires further investigations now considered since our system of co-culture allowed both the observation of a physiological effect of FA on the BBB EC permeability, and the determination of the cellular target of this compound. Specifying the cell type concerned with the observed pharmacological effect enables a rigorous global analysis of the pathways implied in this *in vitro* observed protection, by using for example the DNA chips technology. The use in this study of ECs from knocked out mice to validate the involvement of PPAR- α in this specific biological event, and the first examination of the expression of well known PPAR- α -regulated genes by RT-QPCR may be an important step in the exploration of unexpected pathways under the influence of this nuclear receptor.

In conclusion, we have shown *in vitro* that an activator of PPAR- α exerts a protective action on the BBB ECs, rendering them resistant to the noxious consequences of ischaemic occlusion. The BBB hyperpermeability restriction caused by a preventive treatment is the result of an exclusive targeting of the ECs where defence mechanisms could be triggered with the aim to prevent the early permeability increase occurring after ischaemic occlusion. Such a preventive strategy of neuroprotection which targets the vascular component of the brain does not exclude a possible beneficial action of the fibrate on nervous cells following a chronic treatment or an administration after the onset of the ischaemic episode. For the time being, involvement of the nuclear receptor PPAR- α and absence of regulation of well known target genes represent an initial step in the decipherment of original mechanisms of vascular resistance, and in the long term a chance to discover novel pharmacological therapies to decrease the severity of brain ischaemic stroke in patients with high risk of experiencing this pathology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Mr. Christophe Landry, Mr. Yannick Delplace and Mr Stéphane Nion for analytical and technical contribution. We thank Mr. Emmanuel Bouchaert for providing PPAR- α -/- mice. This study is granted by ANR (Agence Nationale de la Recherche) as a part of an overall project driven within the IFR-114 IMPRT (institut fédératif de recherche 114, Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique) and by the 'Conseil régional du Nord-Pas-de-Calais' (Fellowship to C. Mysiorek). The research leading to these results has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreements n° 201024 and n° 202213 (European Stroke Network).

ABBREVIATIONS

BBB	= Blood-brain barrier
DMEM	= Dulbecco's modified Eagle's medium
EC	= Endothelial cell
FA	= Fenofibric acid
LY	= Lucifer yellow

OGD	=	Oxygen glucose deprivation
MBCEC	=	Mouse brain capillary endothelial cell
PBS	=	Phosphate-buffered saline
P _e	=	Endothelial permeability coefficient
vWF	=	Von Willebrand factor
PPAR- α	=	Peroxisome proliferator-activated receptor – alpha
SOD	=	Cu/Zn superoxide dismutase
ICAM-1	=	Intercellular adhesion molecule-1
VCAM-1	=	Vascular cell adhesion molecule-1
ACO	=	Acyl CoA oxidase
CPT-1	=	Carnitine palmitoyl transferase-1
PK-4	=	Pyruvate dehydrogenase kinase-4
ET-1	=	Endothelin-1

REFERENCES

- Aasum, E, Khalid, AM, Gudbrandsen, OA, How, OJ, Berge, RK, Larsen, TS. (2008) Fenofibrate modulates cardiac and hepatic metabolism and increases ischemic tolerance in diet-induced obese mice. *J Mol Cell Cardiol* **44**: 201-209.
- Abbott, NJ, Ronnback, L, Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**: 41-53.
- Amarencu, P. (2001) Hypercholesterolemia, lipid-lowering agents, and the risk for brain infarction. *Neurology* **57**: S35-44.
- Ayata, C, Ropper, AH. (2002) Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci* **9**: 113-124.
- Benchenane, K, Berezowski, V, Fernandez-Monreal, M, Brillault, J, Valable, S, Dehouck, MP, Cecchelli, R, Vivien, D, Touzani, O, Ali, C. (2005a) Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain barrier from an LRP-dependent to an increased LRP-independent process. *Stroke* **36**: 1065-1070.
- Benchenane, K, Berezowski, V, Ali, C, Fernandez-Monreal, M, Lopez-Atalaya, JP, Brillault, J, Chuquet, J, Nouvelot, A, MacKenzie, ET, Bu, G, Cecchelli, R, Touzani, O, Vivien, D. (2005b) Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* **111**: 2241-2249.
- Berezowski, V, Landry, C, Dehouck, MP, Cecchelli, R, Fenart, L. (2004a) Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an *in vitro* model of the blood-brain barrier. *Brain Res* **1018**: 1-9.
- Berezowski, V, Miecz, D, Marszalek, M, Broer, A, Broer, S, Cecchelli, R, Nalecz, KA. (2004b) Involvement of OCTN2 and B0,+ in the transport of carnitine through an *in vitro* model of the blood-brain barrier. *J Neurochem* **91**: 860-872.
- Betz, AL, Iannotti, F, Hoff, JT. (1989) Brain edema: a classification based on blood-brain barrier integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **1**: 133-154.
- Bloomfield, RH, Davenport, J, Babikian, V, Brass, LM, Collins, D, Wexler, L, Wagner, S, Papademetriou, V, Rutan, G, Robins, SJ. (2001) Reduction in stroke with gemfibrozil in men with coronary heart disease and low HDL cholesterol: The Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Circulation* **103**: 2828-2833.
- Booher, J, Sensenbrenner, M. (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* **2**: 97-105.
- Bordet, R, Ouk, T, Petraut, O, Gele, P, Gautier, S, Laprais, M, Deplanque, D, Duriez, P, Staels, B, Fruchart, JC, Bastide, M. (2006) PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* **34**: 1341-1346.
- Brillault, J, Berezowski, V, Cecchelli, R, Dehouck, MP. (2002) Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J Neurochem* **83**: 807-817.
- Cecchelli, R, Berezowski, V, Lundquist, S, Culot, M, Renfel, M, Dehouck, MP, Fenart, L. (2007) Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 650-661.
- Cecchelli, R, Dehouck, B, Descamps, L, Fenart, L, Buee-Scherrer, VV, Duhem, C, Lundquist, S, Renfel, M, Torpier, G, Dehouck, MP. (1999) *In vitro* model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* **36**: 165-178.
- Chen, J, Simon, R. (1997) Ischemic tolerance in the brain. *Neurology* **48**: 306-311.
- Coisne, C, Faveeuw, C, Delplace, Y, Dehouck, L, Miller, F, Cecchelli, R, Dehouck, B. (2006) Differential expression of selectins by mouse brain capillary endothelial cells *in vitro* in response to distinct inflammatory stimuli. *Neurosci Lett* **392**: 216-220.
- Coisne, C, Dehouck, L, Faveeuw, C, Delplace, Y, Miller, F, Landry, C, Morissette, C, Fenart, L, Cecchelli, R, Tremblay, P, Dehouck, B. (2005) Mouse syngenic *in vitro* blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest* **85**: 734-746.
- Culman, J, Zhao, Y, Gohlke, P, Herdegen, T. (2007) PPAR-gamma: therapeutic target for ischemic stroke. *Trends Pharmacol Sci* **28**: 244-249.
- Culot, M, Lundquist, S, Vanuxeem, D, Nion, S, Landry, C, Delplace, Y, Dehouck, MP, Berezowski, V, Fenart, L, Cecchelli, R. (2008) An *in vitro* blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol In Vitro* **22**: 799-811.
- Dehouck, MP, Fruchart, JC, Cecchelli, R. (1994) Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol* **126**: 465-473.
- Dehouck, MP, Meresse, S, Delorme, P, Fruchart, JC, Cecchelli, R. (1990) An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier *in vitro*. *J Neurochem* **54**: 1798-1801.
- Dehouck, MP, Jolliet-Riant, P, Bree, F, Fruchart, JC, Cecchelli, R, Tillement, JP. (1992) Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between *in vitro* and *in vivo* models. *J Neurochem* **58**: 1790-1797.
- Deplanque, D, Gele, P, Petraut, O, Six, I, Furman, C, Bouly, M, Nion, S, Dupuis, B, Leys, D, Fruchart, JC, Cecchelli, R, Staels, B, Duriez, P, Bordet, R. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. *J Neurosci* **23**: 6264-6271.
- Descamps, L, Dehouck, MP, Torpier, G, Cecchelli, R. (1996) Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am J Physiol* **270**: H1149-1158.
- Editorial (2005) Tackling the global burden of stroke. *Lancet neurology* **4**: 689.
- Fagan, SC, Hess, DC, Hohnadel, EJ, Pollock, DM, Ergul, A. (2004) Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke* **35**: 2220-2225.
- Fruchart, JC, Duriez, P, Staels, B. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **10**: 245-257.
- Gasche, Y, Copin, JC. (2003) [Blood-brain barrier pathophysiology and ischaemic brain oedema]. *Ann Fr D'anesth Reanim* **22**: 312-319.
- Green, AR. (2008) Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *Br J Pharmacol* **153** (Suppl 1): S325-338.
- Hankey, GJ, Warlow, CP. (1999) Treatment and secondary prevention of stroke: evidence, costs, and effects on individuals and populations. *Lancet* **354**: 1457-1463.
- Huang, J, Upadhyay, UM, Tamargo, RJ. (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* **66**: 232-245.
- Inoue, H, Jiang, XF, Katayama, T, Osada, S, Umesono, K, Namura S. (2003) Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice. *Neurosci Lett* **352**: 203-206.
- Inoue, I, Goto, S, Matsunaga, T, Nakajima, T, Awata, T, Hokari, S, Komoda, T, Katayama, S. (2001) The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* **50**: 3-11.
- Iwashita, A, Muramatsu, Y, Yamazaki, T, Muramoto, M, Kita, Y, Yamazaki, S, Mihara, K, Moriguchi, A, Matsuoka, N. (2007)

- Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor delta-selective agonists *in vitro* and *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* **320**: 1087-1096.
- Jonas, S. (1995) Prophylactic pharmacologic neuroprotection against focal cerebral ischemia. *Ann NY Acad Sci* **765**: 21-25; discussion 26-27.
- Kuwabara, K, Murakami, K, Todo, M, Aoki, T, Asaki, T, Murai, M, Yano, J. (2004) A novel selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, 2-methyl-c-5-[4-[5-methyl-2-(4-methylphenyl)-4-oxazolyl]butyl]-1,3-dioxane-r-2-carboxylic acid (NS-220), potently decreases plasma triglyceride and glucose levels and modifies lipoprotein profiles in KK-Ay mice. *J Pharmacol Exp Ther* **309**: 970-977.
- Lee, JM, Grabb, MC, Zipfel, GJ, Choi, DW. (2000) Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* **106**: 723-731.
- Liu, PC, Huber, R, Stow, MD, Schlingmann, KL, Collier, P, Liao, B, Link, J, Burn, TC, Hollis, G, Young, PR, Mukherjee, R. (2003) Induction of endogenous genes by peroxisome proliferator activated receptor alpha ligands in a human kidney cell line and *in vivo*. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**: 71-79.
- Lopez-Atalaya, JP, Roussel, BD, Ali, C, Maubert, E, Petersen, KU, Berezowski, V, Cecchelli, R, Orset, C, Vivien, D. (2007) Recombinant Desmodus rotundus salivary plasminogen activator crosses the blood-brain barrier through a low-density lipoprotein receptor-related protein-dependent mechanism without exerting neurotoxic effects. *Stroke* **38**: 1036-1043.
- Lundquist, S, Renftel, M, Brillault, J, Fenart, L, Cecchelli, R, Dehouck, MP. (2002) Prediction of drug transport through the blood-brain barrier *in vivo*: a comparison between two *in vitro* cell models. *Pharm Res* **19**: 976-981.
- NINDS (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* **333**: 1581-1587.
- NINDS (1997) Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke* **28**: 2109-2118.
- Obrenovitch, TP. (2008) Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. *Physiol Rev* **88**: 211-247.
- Plateel, M, Teissier, E, Cecchelli, R. (1997) Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J Neurochem* **68**: 874-877.
- Plateel, M, Dehouck, MP, Torpier, G, Cecchelli, R, Teissier, E. (1995) Hypoxia increases the susceptibility to oxidant stress and the permeability of the blood-brain barrier endothelial cell monolayer. *J Neurochem* **65**: 2138-2145.
- Savitz, SI, Fisher, M. (2007) Prophylactic neuroprotection. *Curr Drug Targets* **8**: 846-849.
- Simard, JM, Kent, TA, Chen, M, Tarasov, KV, Gerzanich, V. (2007) Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol* **6**: 258-268.
- Staels, B. (2007) PPAR agonists and the metabolic syndrome. *Therapie* **62**: 319-326.
- Zlokovic, BV. (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**: 178-201.

Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la protection pharmacologique de la BHE contre l'ischémie cérébrale : première analyse du transcriptome endothélial.

Introduction

PPAR- α est un récepteur nucléaire qui, une fois activé par un agoniste comme le fénofibrate, régule l'expression de nombreux gènes cibles en se fixant sur son élément de réponse (PPRE) localisé au niveau du promoteur de ces gènes. Dans nos expériences, l'effet protecteur mesuré sur les cellules endothéliales de BHE apparaît suite à un traitement préventif de 24h ou au moment de l'incubation des cellules en OGD. Le fénofibrate est alors présent avant que les effets délétères de l'OGD ne s'exercent sur l'endothélium. Ceci suggère le déclenchement préventif d'un mécanisme de défense qui rendrait les cellules endothéliales résistantes à l'hyperperméabilité induite par l'OGD. De plus, l'absence de protection mesurée sur les cellules endothéliales PPAR- α KO a démontré l'implication de l'activation de ce récepteur nucléaire dans le phénomène de protection. Lors d'une première approche, nous avons quantifié par RT-qPCR l'expression d'un set de 7 gènes décrits comme cibles de PPAR- α . Puisque la protection est mesurée suite à un traitement préventif, nous avons analysé la condition normoxie témoin non traitée et les deux conditions normoxiques traitées pendant 4h et 24h avec l'acide fénofibrique. Les gènes analysés sont ACO (acyl coenzymeA oxidase) et CpT1 (carnitine palmitoyl transferase-1) impliqués dans le métabolisme lipidique, PDK-4 (pyruvate dehydrogenase kinase-4) impliqué dans le métabolisme glucidique. Mais également des gènes impliqués dans l'inflammation, comme ICAM-1 (Inter cellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1) ET-1 (Endothelin-1) ainsi que dans le stress oxydant, comme SOD-1 (Cu-Zn superoxide dismutase). Cependant, aucune régulation préventive d'expression de gènes n'a été mesurée dans nos conditions. Ceci a démontré que la protection observée est indépendante de la modulation du métabolisme lipidique et glucidique, en accord avec une récente étude (Deplanque et al. 2003). De plus, le stress oxydant et l'inflammation apparaissent plus tardivement dans la progression de la pathologie et sont présents dans des études de l'ischémie cérébrale comprenant la reperfusion.

Ainsi l'analyse en RT-qPCR de ces gènes, n'ayant pas montré de modulation d'expression, suggère l'implication d'un mécanisme plus complexe dans le phénomène de protection qui nécessite une approche plus globale.

Matériels et Méthodes

Analyse globale du transcriptome par l'utilisation de la puce à ADN sur système Agilent:

L'utilisation d'une puce à ADN permet une analyse globale de l'ensemble des gènes dont l'expression est modulée dans les conditions expérimentales. Notre étude a utilisé une puce CGH (Comparative Genome Hybridization) qui permet la comparaison des variations d'expression de gènes entre deux conditions expérimentales. La puce utilisée (Agilent mouse genome CGH microarray 44K) est une lame de verre sur laquelle on trouve des « spots » dont chacun correspond à une zone sur la puce contenant plusieurs copies identiques d'un même gène appelées sondes (séquences oligonucléotitiques). L'ensemble des sondes représente la totalité du génome de la souris.

Les échantillons à analyser sont des extraits d'ARN totaux obtenus par lyse des cellules endothéliales grâce au tampon de lyse RLT (Qiagen, Valencia, CA, USA), puis purification à l'aide d'un kit d'extraction des ARN totaux (Qiagen, Valencia, CA, USA). Les étapes suivantes consistent en une synthèse des ADNc (ADN complémentaires) par RT (reverse transcriptase) puis des ARNc (ARN complémentaires) qui seront hybridés sur la puce.

Afin de pouvoir comparer l'expression des gènes entre les deux conditions expérimentales, les échantillons à analyser sont marqués par fluorescence par incorporation de fluorochromes lors de la synthèse des ARNc. Deux fluorochromes différents sont utilisés, la CyanineTM3 (Cy3 : indodicarbocyanine 3-1-O (2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidite) qui présente un spectre d'émission dans le rouge et la CyanineTM5 (Cy5 : indodicarbocyanine 5-1-O (2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidite) qui présente un spectre d'émission dans le vert. Ceci permet, après marquage, d'hybrider simultanément deux cibles sur une même sonde. La fixation des échantillons sur la puce se fait par hybridation compétitive. Le résultat de l'hybridation est obtenu par une analyse de la fluorescence grâce à un lecteur capable de discriminer les deux fluorochromes (figure 24).

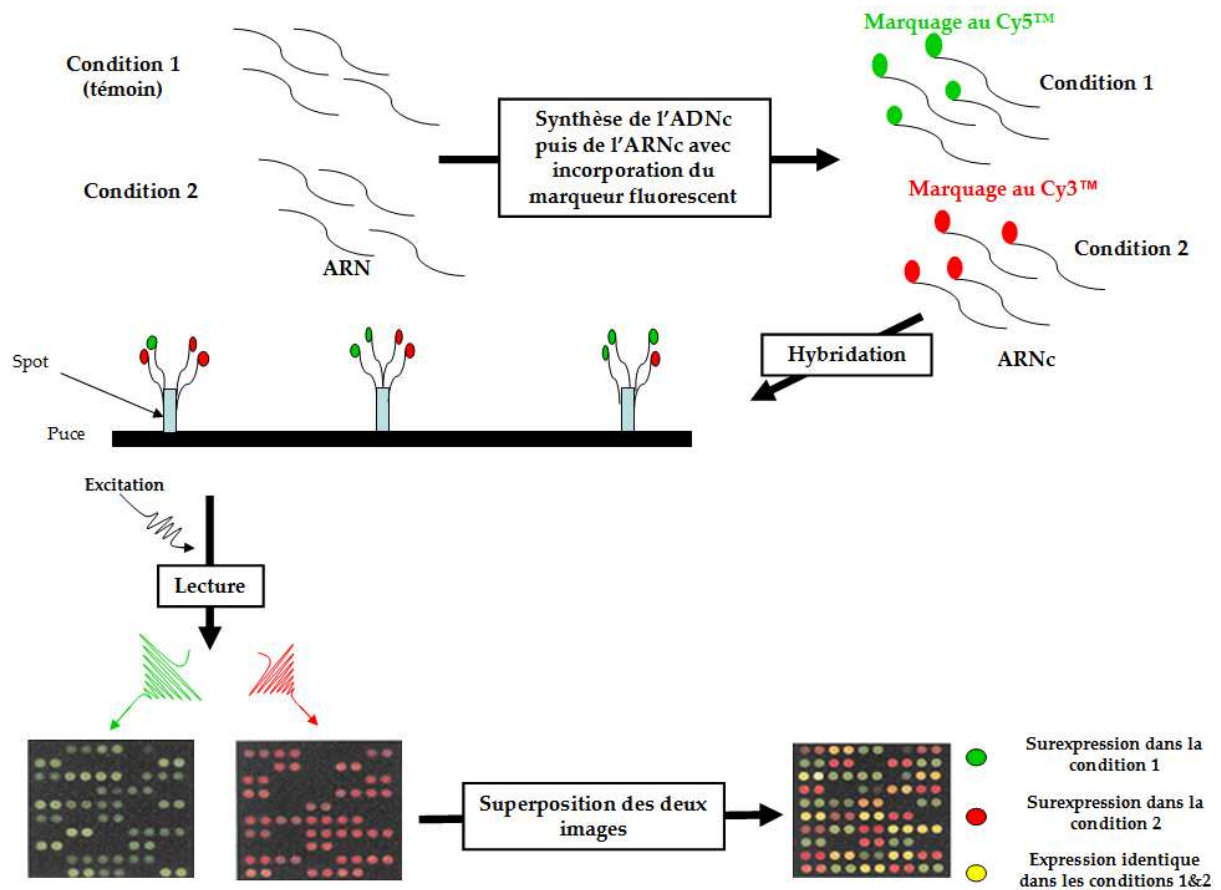


Figure 24 : Représentation schématique d'un protocole d'analyse par puce à ADN.

Le photomultiplicateur mesure l'intensité du signal émis par le spot après excitation de CyTM3 puis le signal émis par CyTM5. Ainsi après superposition des signaux, un excès du gène X dans la condition 1 marqué par le fluorochrome vert donnera un signal vert, un excès du gène Y dans la condition 2 marqué par le fluorochrome rouge donnera un signal rouge alors qu'une expression équivalente du gène Z dans les deux conditions donnera un signal jaune. Les résultats sont calculés en faisant le ratio des intensités de fluorescence rouge/vert pour chacun des spots, ce qui permet de rechercher une expression différentielle des gènes dans les deux échantillons biologiques étudiés. Un coefficient est attribué à chaque gène, il correspond au facteur d'induction et traduit la modulation de l'expression du gène entre les deux conditions. Les résultats bruts nous donnent une liste non exhaustive de gènes obtenus pour des paramètres précis comprenant un niveau d'expression supérieur à 50 (unité arbitraire) ainsi qu'un facteur d'induction supérieur à 1,25.

Analyse quantitative de l'expression de gènes par PCR quantitative en temps réel (real time quantitative polymerase chain reaction : RT-qPCR).

Une analyse par RT-qPCR permet d'obtenir en temps réel une quantification de l'expression de gènes. Suite aux conditions expérimentales les ARN totaux sont extraits suite à une lyse des cellules endothéliales dans un tampon RLT (RLT lysis buffer, Qiagen, Valencia, CA, USA). L'extraction s'effectue grâce au kit Qiagen RNA extraction kit. Après dosage, les ARN subissent une étape de transcription inverse à l'aide du kit high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems), afin d'obtenir les ADN complémentaires (ADNc). La PCR quantitative est réalisée à partir des ADNc synthétisés et des sondes spécifiques des gènes à étudier. Le niveau d'expression des gènes est déterminé grâce au « Brilliant II SYBR® Green QPCR master mix ». Le SYBR® green est une sonde fluorescente capable de se fixer sur l'ADN double brin. Au fur et à mesure de la synthèse, la quantité de sonde fluorescente fixée sera proportionnelle à la quantité d'ADNc synthétisé. La mesure de la fluorescence en fin de chaque étape d'élongation permet la quantification des transcrits synthétisés. L'expression d'un gène est calculée en fonction du Ct (crossing threshold) qui correspond au point d'intersection entre la pente du signal émis par la sonde amplifiée dans sa phase exponentielle et l'intensité seuil du bruit de fond. Ce point détermine le nombre de cycles qui a été nécessaire. Plus un gène sera exprimé, plus le nombre de ses transcrits avant amplification sera grand, plus le Ct sera obtenu à un nombre de cycles bas. Le gène de la cyclophiline est utilisé comme un témoin interne pour la normalisation des variations des quantités d'ARN. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (standart error of the mean).

Résultats et discussion

Analyse globale de l'expression des gènes par puce à ADN

A la vue des premiers résultats, une approche plus globale du profil des gènes régulés était nécessaire. Pour cela, nous avons entrepris une analyse du profil d'expression génique grâce à la technologie des puces à ADN sur système Agilent permettant l'analyse de l'ensemble du génome de la souris afin d'identifier et de comparer le profil d'expression des gènes entre deux conditions. La régulation de l'expression génique *via* l'interaction de PPAR- α activé sur son PPRE est un processus relativement long, nous avons alors fait le choix d'effectuer l'analyse par comparaison de la condition témoin avec la condition ayant subi le traitement le plus long, c'est à dire le traitement de 24h à l'acide fénofibrique. Pour chaque condition expérimentale analysée, les échantillons sont un mélange d'ARN provenant de deux expérimentations indépendantes.

Les résultats obtenus nous donnent une première liste de gènes dont la modulation est relativement faible puisque les facteurs d'induction n'excèdent par 2,3. Les gènes obtenus sont majoritairement impliqués dans l'inflammation (IL1R1, Sele, Cxcl1, Cxcl2, Icosl, IL33, ICAM-1; VCAM-1, Itga4, adamdec1). On retrouve également des facteurs de transcription (Foxg1, Six2) ainsi que des gènes codants pour des protéines impliquées dans le transport vésiculaire et la perméabilité cellulaire (Trim 9, Vat 1, Dyncth1, Actgps 1, Hip1, Mkl1) des canaux ioniques (Kcne2) et d'autres gènes (Lgi2, Mlc1, P2rx1, Tmeff2, Zpb1, Lims1, Plcb1) aux fonctions diverses renseignées dans le tableau 1.

Première analyse du transcriptome endothéliale

accession number	Symbole	Nom/Fonction	Facteur d'induction
NM_010743	Il1r1	Interleukin 1 receptor type 1/ récepteur de l'interleukine 1	2,300258
NM_011345	Sele	E-Selectine/ Adhésion neutrophile cellule endothéliale	1,9159622
NM_144945	Lgi2	leucine-rich repeat LGI family, member 2/	1,9016659
NM_133241	Mlc1	megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1 homolog/ fonction hypothétique de canal cationique	1,8253088
NM_011028	P2rx1	purinergic receptor P2X-like 1, orphan receptor (P2rx1)	1,8061804
NM_009140	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2/ chemoattraction des neutrophiles	1,7812651
NM_019677	Plcb1	phospholipase C beta 1/ enzyme impliqué dans la transduction du signal	1,7770394
NM_008241	Foxg1	Forkhead box protein 1/facteur de transcription	1,7611918
NM_134110	Kcne2	potassium voltage-gated channel subfamily E member 2 /canal potassique voltage dépendant	1,7015532
NM_008176	Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1/ chemoattraction des neutrophiles	1,6432315
NM_015790	Icosl	Inductible T cell co-stimulator ligand/ costimulateur dans la prolifération des cellules T et la sécrétion de cytokines	1,5563908
NM_011380	Six2	Sine oculis homeobox homolog 2/ facteur de transcription	1,5508415
NM_133775	Il33	interleukin 33/ cytokine	1,5404456
AK129109	Trim9	Tripartite motif containing 9/ impliqué dans la régulation de l'exocytose	1,5337069
NM_173016	vat1	vesicule amine transport proteine 1/ transport vésiculaire	1,5258541
NM_019790	Tmeff2	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2/ impliqué dans la prolifération cellulaire	1,5104401
NM_010493	Icam1	intercellular adhesion molecule-1/ adhésion leukocyte cellule endothéliale	1,2674582
NM_011693	Vcam1	vascular endothelial adhesion molecule-1/ adhésion leukocyte cellule endothéliale	1,2653141
Z83808	Dync1h1	Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1/ microtubule-activated ATPase nécessaire à mobilité des vésicules et organites le long des microtubules	-2,1715093
NM_021394	Zbp1	Z-DNA binding protein 1/ liaison à l'ADN	-1,8275299
AK029200	Actg-ps1	Actine pseudo gène/protéine du cytosquelette	-1,6305432
AK041695	Pag1	Phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomain 1/protéine de régulation de l'activation des lymphocytes T	-1,619817
AK087586	Hip1	huntingtin-interacting protein 1/ cofacteur du processus d'endocytose, associé à la clathrine	-1,5988101
NM_021475	Adamdec1	decysin 1/famille des desintegrin metalloproteinase	-1,5939934
AK037958	Mkln1	Muskelin 1/protéine de transduction du signal et de modulation du cytosquelette	-1,5853792
AK087984	Lims1	LIM and senescent cell antigen like domain1/protéine effectrice des intégrines	-1,5584944
AK037794	Itga4	integrine alpha 4/impliqué dans le recrutement des lymphocytes T	-1,5316092

Tableau 7 : Résultats issus de la puce à ADN des gènes dont l'expression est modulée suite au traitement des cellules endothéliales à l'acide fénofibrique dans les conditions témoins. Le facteur d'induction traduit la modulation de l'expression induite par l'acide fénofibrique. Les gènes qui apparaissent en gras seront ensuite analysés individuellement par RT-qPCR.

Cependant avant d'effectuer une interprétation plus approfondie de ces données, une validation des résultats obtenus est nécessaire par une analyse individuelle de certains gènes par RT-qPCR. Les gènes choisis sont ICAM-1, Cxcl1, Cxcl2, IL1R1 et la E-sélectine (en gras dans le tableau 1). Les résultats sont présentés dans la figure 25.

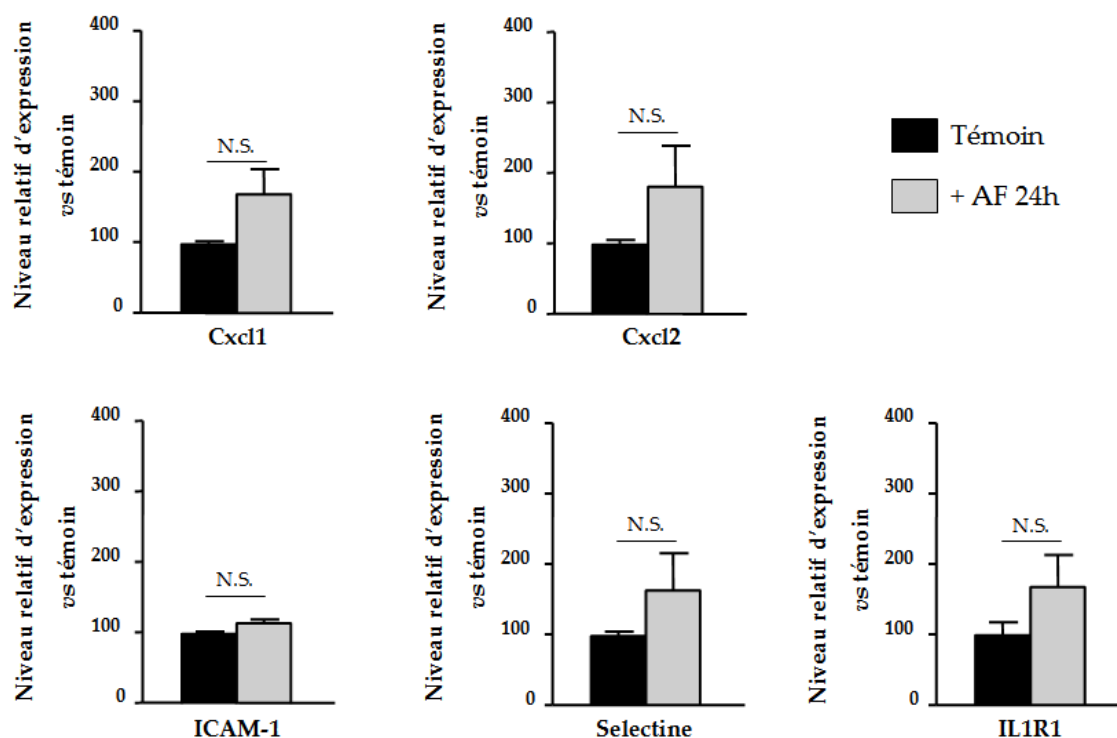


Figure 25 : Analyse par RT-qPCR de l'expression dans les cellules endothéliales de gènes ciblés pour la validation des résultats de la puce à ADN.

Analyse en PCR quantitative des gènes codants pour Cxcl-1, Cxcl-2, ICAM-1, sélectine, IL1R1 et la cyclophiline réalisée à partir d'ARN totaux isolés de cellules endothéliales traitées ou non pendant 24h avec l'acide fénofibrique. L'expression des ARN messagers (ARNm) des gènes étudiés est normalisée avec celle de la cyclophiline et est exprimée en induction relative comparée au niveau d'expression des gènes dans la condition témoin non traitée correspondant à 100%. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Les analyses statistiques sont réalisées par un test Bonferroni (One-way ANOVA) $n=6$; N.S.: Non Significatif, AF : acide fénofibrique.

A l'issue de l'analyse du transcriptome, les gènes obtenus pouvaient sembler initialement intéressants. Cependant la validation par l'analyse en RT-qPCR de gènes choisis, ne montre en réalité aucune variation significative de l'expression de ces gènes entre la condition témoin et la condition traitée par l'acide fénofibrique. Cette variation d'expression proviendrait alors d'une régulation due au hasard.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats démontre une absence de régulation transcriptionnelle de gènes dans les cellules endothéliales soumises au traitement préventif. La protection ne semblerait donc pas être liée à l'activation ou la répression de gènes exprimés en normoxie. Ceci écarte l'hypothèse d'une modulation transcriptionnelle de l'expression basale des gènes dans les cellules endothéliales de la BHE par PPAR- α .

Ces résultats suggèrent alors une modulation transcriptionnelle uniquement des gènes induits par l'OGD et démontrent la nécessité d'effectuer une analyse de l'expression des gènes dans ces

conditions pathologiques. Pour cela, nous avons étudié l'expression des gènes, codants pour les cytokines TNF- α (Feuerstein et al. 1994), IL1- β (Buttini et al. 1994), IL-6, ET-1 (Huang et al. 2006) ainsi que le récepteur IL1R1 (Wang et al. 1997) induits suite à l'hypoxie ou l'OGD (figure 25). Nous avons également analysé l'expression de gènes codants pour les chimiokines cxcl-1 et cxcl-2 ainsi que pour la molécule d'adhésion E-sélectine (Zhang et al. 1998) (figure 26). Enfin nous avons analysé l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 induites pendant la réoxygénation (Flamant et al. 2009) (figure 27).

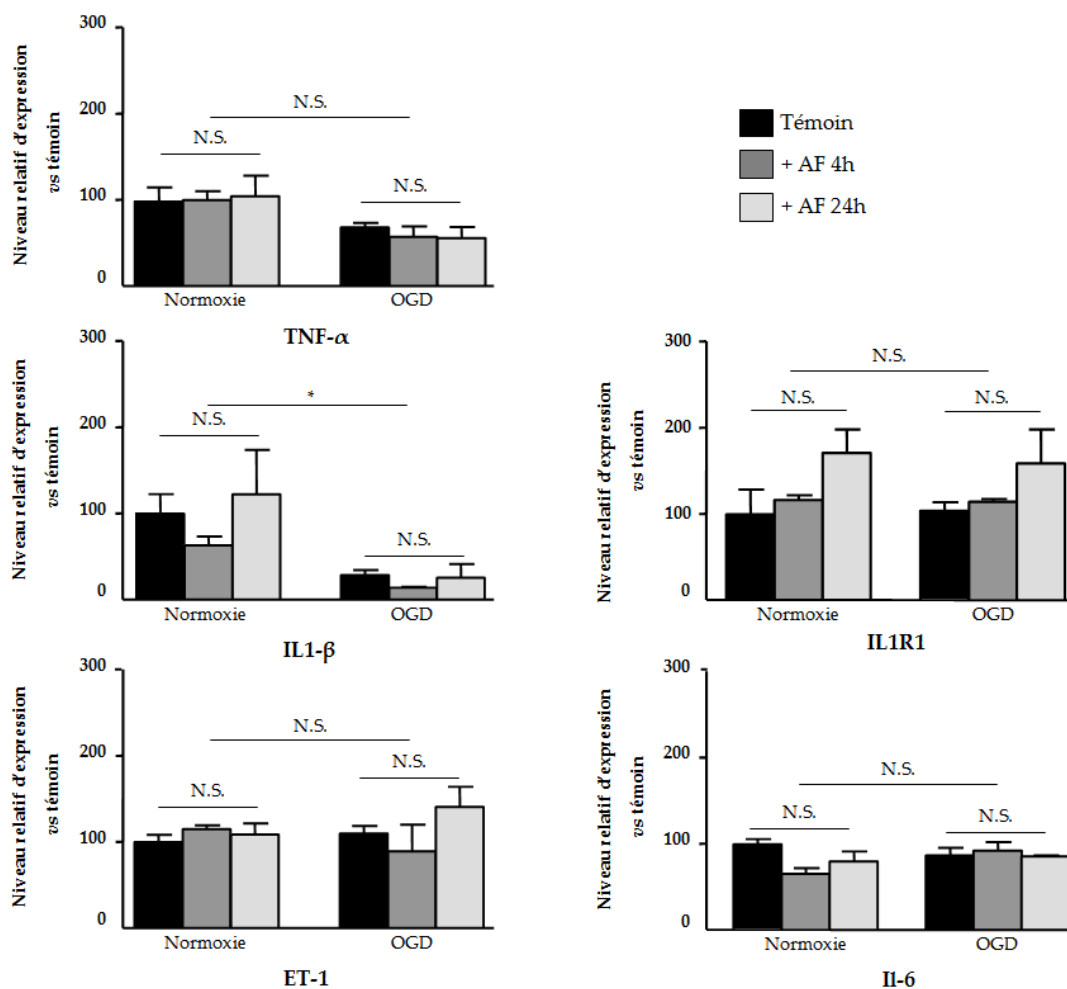


Figure 26 : Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes TNF- α , IL1- β , IL1R1, IL-6, ET-1, dans les cellules endothéliales de BHE en condition d'OGD avec ou sans traitement à l'acide fénofibrique.

Analyse en PCR quantitative des gènes codants pour TNF- α , IL1- β , IL1R1, IL-6, ET-1 et la cyclophiline réalisée à partir d'ARN totaux isolés de cellules endothéliales traitées ou non pendant 24h ou 4h avec l'acide fénofibrique. L'expression des ARN messagers (ARNm) des gènes étudiés est normalisée avec celle de la cyclophiline et est exprimée en induction relative comparée au niveau d'expression des gènes dans la condition contrôle normoxie non traitée correspondant à 100%. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Les analyses statistiques sont réalisées par un test Bonferroni (One-way ANOVA) * $p < 0,05$, $n=3$. AF: acide fénofibrique, N.S.: Non Significatif.

L'analyse de l'expression des gènes codants pour les cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL1- β , IL1R1, ET-1 et IL-6 montre une absence de régulation de ces gènes en OGD (figure 26). Il n'y

a donc pas d'induction d'expression de ces cytokines en OGD. Bien que le gène codant pour IL1- β montre une diminution de son expression dans les conditions d'OGD.

Trois gènes uniquement, codant pour la E-sélectine, Cxcl1 et Cxcl2 présentent une augmentation de leur expression en OGD qui est diminuée de façon significative suite au traitement à l'acide fénofibrique (figure 27).

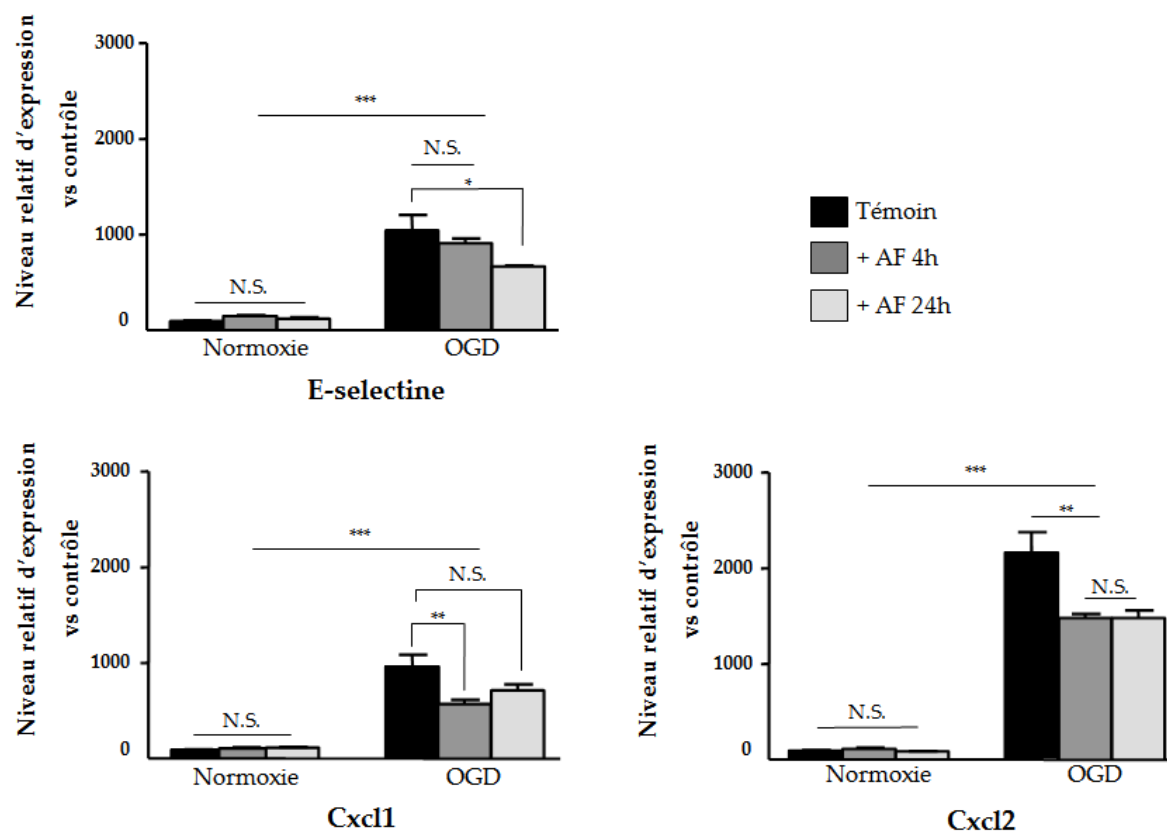


Figure 27 : Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes cxcl1, cxcl2, E-selectine dans les cellules endothéliales de BHE en condition d'OGD avec ou sans traitement à l'acide fénofibrique.

Analyse en PCR quantitative des gènes codants pour cxcl1, cxcl2, E-selectine et la cyclophiline réalisée à partir d'ARN totaux isolés de cellules endothéliales traitées ou non pendant 24h ou 4h avec l'acide fénofibrique. L'expression des ARN messagers (ARNm) des gènes étudiés est normalisée avec celle de la cyclophiline et est exprimée en induction relative comparée au niveau d'expression des gènes dans la condition contrôle normoxie non traitée correspondant à 100%. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Les analyses statistiques sont réalisées par un test Bonferroni (One-way ANOVA) *** $p < 0,001$. AF : acide fénofibrique, N.S.: Non Significatif.

Les chimiokines cxcl1 et cxcl2, ainsi que la E-sélectine qui est une molécule d'adhésion participent au processus d'inflammation, et semblent être des cibles de l'action protectrice du fénofibrate. Les sélectines sont des molécules d'adhésion sécrétées de façon précoce et de manière transitoire au cours de l'ischémie cérébrale, elles sont les premières molécules d'adhésion à être sécrétées mais également à être en contact avec les neutrophiles (Zhang et al. 1998). Elles participent au roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium. Une précédente étude sur l'inflammation menée au laboratoire et utilisant le modèle murin avait

déjà démontré l'induction de l'expression des sélectines au niveau des cellules endothéliales de la BHE suite à une stimulation des cellules au LPS, suggérant un rôle de ces molécules dans l'inflammation au niveau de la BHE (Coisne et al. 2006).

De plus, l'induction de l'expression des chimiokines est un phénomène précoce dans l'initiation des mécanismes inflammatoires post-ischémiques. Le rôle de ces molécules est d'attirer les leucocytes au niveau de l'endothélium. Des études rapportent une augmentation de l'expression de Cxcl1 et de Cxcl2 mesurée lors de la phase aiguë de l'ischémie (Losy et al. 2005; Vikman et al. 2007).

L'analyse d'expression des gènes rapportés comme étant régulés lors de la reperfusion montre un profil tout à fait différent (figure 28).

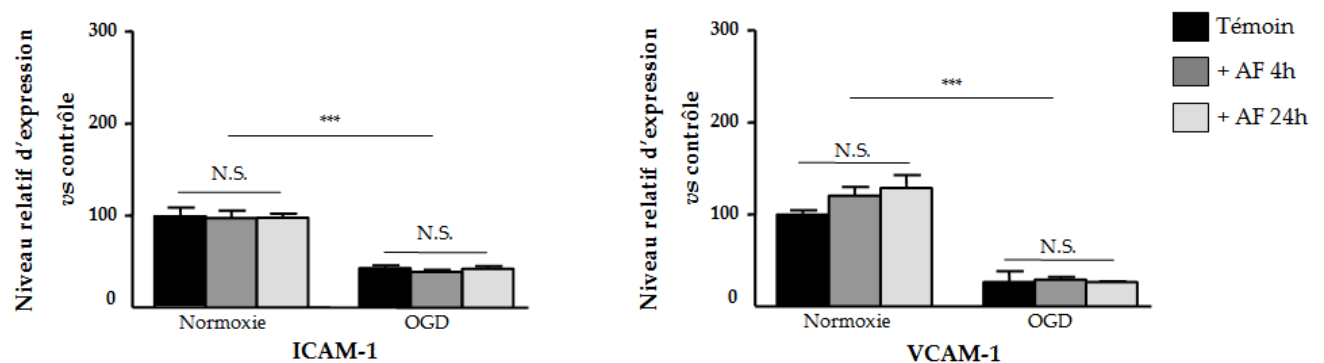


Figure 28 : Analyse par PCR quantitative de l'expression des gènes codants pour ICAM-1 et VCAM-1 pour la validation des résultats de la puce à ADN.

Analyse en PCR quantitative des gènes codants pour ICAM-1, VCAM-1 et la cyclophiline réalisée à partir d'ARN totaux isolés de cellules endothéliales dans les conditions de normoxie ou d'OGD traitées ou non pendant 24h ou 4h avec l'acide fénofibrique. L'expression des ARN messagers (ARNm) des gènes étudiés est normalisée avec celle de la cyclophiline et est exprimée en induction relative comparée au niveau d'expression des gènes dans la condition de normoxie non traitée correspondant à 100%. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. Les analyses statistiques sont réalisées par un test Bonferroni (One-way ANOVA) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n=3$ N.S.: Non Significatif.

L'expression de ICAM-1, VCAM-1 est diminuée de 30% à 50% en OGD. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études démontrant que l'expression de ces molécules d'adhésion est liée à la disponibilité de l'oxygène. Par conséquent leur expression est diminuée en hypoxie et induite lors de la réoxygénation ou dans le cas d'un traitement au TNF- α (Willam et al. 1999) *via* l'activation de NF- κ B. Ce facteur de transcription est activé de manière importante lors de la réoxygénation (Flamant et al. 2009). Ceci expliquerait la diminution de l'expression de ces molécules d'adhésion dans nos conditions ischémiques *in vitro* qui miment la phase d'occlusion, donc la phase précoce de l'ischémie cérébrale lorsque le taux d'oxygène et de glucose chutent radicalement.

Conclusion

Le but de cette étude a été d'identifier les gènes régulés par le PPAR- α activé lors d'un traitement protecteur de la BHE. L'absence de régulation des gènes dans les conditions de normoxie, suggère que le mécanisme de protection ne consisterait pas en une régulation préventive de l'expression des gènes endothéliaux.

La première analyse par RT-qPCR en OGD a permis de vérifier que ce stress pouvait augmenter l'expression de gènes, et suggère qu'une action transcriptionnelle est alors possible mais seulement sur des gènes régulés par l'OGD. Trois gènes uniquement, induits pas le stress de l'OGD montrent une diminution modérée de l'expression suite au traitement par le fénofibrate. Cette diminution modérée ne peut expliquer la protection efficace mesurée sur la perméabilité des cellules endothéliales. En effet, la protection endothéliale est observée lors de l'OGD alors que l'induction de ces gènes inflammatoires présente des conséquences plus tardives lors de la reperfusion. Par conséquent, cet effet transcriptionnel observé sur les gènes Cxcl1, Cxcl2 et la E-sélectine ne semble pas être le seul mécanisme responsable de l'effet protecteur mesuré sur la perméabilité endothéliale.

Une approche globale, par puce à ADN, d'analyse de l'expression des gènes en OGD avec ou sans traitement au fénofibrate permettrait l'identification des voies de signalisation régulées suite à l'activation de PPAR- α dans les cellules endothéliales.

Cependant, bien qu'aucune régulation préventive de l'expression de gènes ne soit observée en normoxie, nous ne pouvons pas exclure l'implication de mécanismes non génomiques, comme des modifications post traductionnelles, que nous pourrions identifier par une analyse différentielle du protéome.

Etude des effets de la réoxygénation sur la BHE ischémique

III.1 Introduction

Lors d'un AVC ischémique, l'arrêt du flux sanguin provoque le déclenchement d'une cascade physiopathologique dont la conséquence, au sein du parenchyme cérébral, est la mort des cellules nerveuses. Cependant une modulation des propriétés de la BHE apparaît de manière précoce. Dans les conditions physiologiques, la BHE présente des propriétés spécifiques et restrictives afin de maintenir l'homéostasie du système nerveux central (Hawkins and Davis 2005). Lors de l'ischémie cérébrale, on observe une altération précoce de la BHE, elle se traduit par une augmentation exacerbée de la perméabilité vasculaire dont la progression amène à la formation d'un œdème vasogénique accélérant les lésions parenchymateuses, démontrant ainsi que l'ischémie cérébrale est avant tout une pathologie vasculaire aux conséquences neuronales. De plus, bien que la reperfusion soit essentielle à la préservation du tissu cérébral aux dommages neurologiques irréversibles, la reperfusion entraîne le déclenchement de mécanismes délétères (stress oxydant et inflammation) qui accentuent considérablement les dommages vasculaires et par conséquent le risque d'une hémorragie cérébrale.

Bien qu'il existe un délai entre les premiers signes de rupture de la BHE et la constitution de l'œdème vasogénique, l'altération de la fonction restrictive de la BHE se manifeste de manière progressive (Fagan et al. 2004). Ceci souligne l'importance de l'intégrité de la BHE dans la prise en charge clinique des AVC à tel point que son concept est pris en considération dans les critères d'exclusion pour la thérapie thrombolytique, le seul traitement existant à ce jour lors de la phase aiguë de l'ischémie cérébrale, limitant son utilisation à 5% des patients (NINDS 1995, 1997).

De nombreuses études se sont pourtant intéressées au profil de perméabilité de la BHE lors de l'ischémie/reperfusion. En effet, les premières études *in vivo* montrent un profil d'ouverture biphasique de la perméabilité de la BHE avec une augmentation précoce suivie d'une période réfractaire pendant laquelle la BHE est refermée, avant une seconde augmentation retardée (Kuroiwa et al. 1985; Belayev et al. 1996; Rosenberg et al. 1998; Huang et al. 1999). Mais des études plus récentes mettent en avant l'absence de récupération la BHE à la première augmentation de perméabilité (Kastrup et al. 1999; Wu et al. 2001; Nagel et al. 2004; Veltkamp et al. 2005) indiquant que la BHE reste ouverte pendant les jours (Nagel et al. 2008) et les semaines suivant l'AVC (Lin et al. 2002; Durukan et al. 2008; Strbian et al. 2008). Il n'y a donc actuellement pas d'explications définitives à cette dynamique d'ouverture de la BHE. Ces données expérimentales démontrent la nécessité d'identifier les mécanismes cellulaires et

moléculaires impliqués dans la réponse de la BHE au stress de la reperfusion. Ainsi, nous disposons au laboratoire d'un modèle bovin *in vitro* de BHE, constitué d'une co-culture de cellules endothéliales avec des cellules gliales, utilisé notamment dans l'étude des phénomènes précoces de l'ischémie cérébrale lors d'expériences appelée OGD (Oxygen-glucose deprivation) mimant les conséquences immédiates de l'occlusion (Brillault et al. 2002; Culot et al. 2009). Ces conditions ont été ici adaptées sur le modèle syngénique murin dans le cadre d'une approche pharmacologique de protection de la BHE lors de cette phase précoce.

Afin de se rapprocher de l'ischémie cérébrale *in vivo* qui comprend la reperfusion, nos conditions expérimentales ont été adaptées à l'étude de la réoxygénation sur la perméabilité de la BHE. Pour cela, après une incubation en condition d'OGD, la co-culture est replacée dans un milieu réoxygéné et glucosé pendant une période allant de 2h à 24h. Dans le but d'identifier les mécanismes cellulaires responsables des modulations de la perméabilité vasculaire nous avons étudié l'ultrastructure des jonctions serrées par microscopie électronique à transmission en collaboration avec le Dr. Brigitte ARBEILLE du Laboratoire de Biologie Cellulaire et de Microscopie électronique de la Faculté de Médecine de Tours. De plus, en collaboration avec la plateforme d'imagerie du vivant de l'IMPRT-IFR 114 nous avons réalisé l'étude en IRM de diffusion des mouvements d'eau *in vivo* chez la souris qui a permis la mesure des perturbations de l'homéostasie hydrique du parenchyme cérébral au voisinage de l'occlusion dans les étapes précoces mais aussi dans les étapes tardives de la reperfusion.

III.2 Matériels et Méthodes

Les animaux :

Les expériences réalisées *in vivo* et pour le modèle *in vitro* ont nécessité la manipulation de souris de fond génétique C57Bl/6J (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) en accord avec la législation française sur l'expérimentation animale (international permission number: A62-498-5).

Modèle *in vitro* de BHE :

Extraction des cellules endothéliales :

Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux sont isolées à partir de cortex cérébraux issus de souris âgées de 3 à 4 semaines conformément au protocole expérimental décrit par (Coisne et al. 2005). Après avoir retiré les méninges, les cortex sont homogénéisés à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce dans une solution saline tamponnée de Hank's (HBSS, contenant 10mM HEPES et 0.1% BSA). L'homogénat ainsi obtenu est mélangé à une solution de dextran à 30% (v/v, poids moléculaire 100,000 - 200,000) afin d'éliminer les composants neuronaux. Le culot vasculaire est resuspendu dans le HBSS et filtré au travers d'un tamis d'une porosité 59µm afin de retenir les gros vaisseaux sur le tamis alors que les capillaires passent au travers. La fraction enrichie en capillaires ainsi obtenue subit une digestion enzymatique avec de la collagénase dispase (2 mg/ml) (Roche Diagnostics, Meylan, France) pendant 33 minutes à 37°C dans du HBSS supplémenté de 10 µg/ml de DNase I (Roche Diagnostics, Meylan, France) et de 0.147 µg/ml de Tosyl-lysine-chloromethyl-ketone (TLCK, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Après de nombreux rinçages, la suspension de capillaires obtenue estensemencée à raison de 51000 capillaires digérés par cm² d'un insert filtré de type Transwell™ comportant une membrane de polyester d'une porosité de 0.4 µm (Costar® Corning incorporated, NY, NY, USA) préalablement recouverte de matrigel (BD Biosciences, Le pont de claix, France). Le milieu de culture est un milieu de base DMEM (Dulbelcco's modified Eagle medium) additionné de 15% de sérum de veau, 50X d'acides aminés, 100X de vitamines (Sigma Aldrich), 50 µg/ml de gentamycin, 2 mM de glutamine et 1 ng/ml du facteur de croissance bFGF (basic fibroblast growth factor).

Culture des cellules gliales :

La culture de cellules gliales primaires de souris est réalisée à partir de cortex de cerveaux de souris C57Bl/6 de moins de trois jours selon la méthode décrite par Booher et Sensenbrenner (Booher and Sensenbrenner 1972). Après avoir éliminé les méninges, le tissu est dissocié en forçant doucement le passage du tissu cérébral à travers un tamis d'une porosité de 80 μ m. Les cellules gliales sontensemencées dans le fond de plaque de format 12 puits préalablement recouvert de Poly-D-lysine à raison de 1.2×10^5 cellules /mL de milieu, composé de milieu de base DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau nouveau-né, de 2 mM glutamine et de 50 μ g gentamycine maintenu dans un environnement à 37°C avec une atmosphère à 5% de CO₂. Le milieu de culture est renouvelé deux fois par semaine et à l'issue de trois semaines de culture la population de cellules gliales est stabilisée et se compose d'astrocytes (84%), d'oligodendrocytes (11%) et de cellules microgliales (6%) (Coisne et al. 2005).

Modèle de co-culture :

La mise en co-culture des cellules est réalisée 24h après l'ensemencement des cellules endothéliales. L'insert filtré comportant la monocouche de cellules endothéliales est positionné au dessus du puits de cellules gliales préalablement cultivées pendant trois semaines. Dans ces conditions, le modèle recrée la situation observée *in vivo* pour laquelle l'insert contenant les cellules endothéliales représente le compartiment sanguin (compartiment luminal) et le fond du puits contenant la culture de cellules gliales représente le compartiment cérébral (compartiment abluminal)(figure 29).

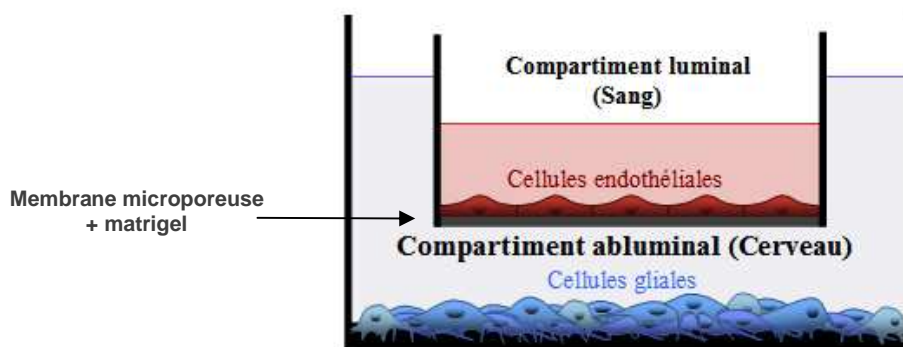


Figure 29 : Modèle de BHE *in vitro*.

L'incubation dans les conditions d'OGD/réoxygénation :

A l'issue des cinq jours de co-culture, et 24h après le dernier changement de milieu, les cellules sont incubées dans des conditions mimant l'ischémie cérébrale. Cette expérience consiste à recréer les conditions d'ischémie reperfusion, en incubant le modèle de co-culture dans des conditions de privation en oxygène et en glucose (OGD) puis dans un milieu oxygéné et glucosé. Pour cela, le jour de l'expérimentation, les cellules sont incubées dans un environnement ischémique en remplaçant le milieu de culture par un milieu dépourvu de glucose, de serum et d'oxygène obtenu par équilibration du milieu avec de l'azote (37°C, 5% CO₂, 95% N₂, 0g/l de glucose, sans serum). Les co-cultures sont ainsi placées pendant quatre heures à l'intérieur d'un sachet anaérobie GasPack EZ (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) dans un incubateur à 37°C au sein d'une enceinte anaérobie (Forma Scientific, Mountain View, CA, USA) dont l'atmosphère est contrôlée à l'aide d'une sonde à oxygène afin de maintenir un taux d'O₂ à un maximum de 0,1% (GOX 100, Greisinger electronic GmbH, Germany). Pour les témoins de normoxie, le milieu sans serum à 1g/l de glucose est équilibré avec l'air atmosphérique (37°C, 5%CO₂, 95% air, 1g/L de glucose, sans serum). Pour l'ensemble des expériences, le pH du milieu reste inchangé lors des conditions de normoxie et d'OGD.

Au bout de quatre heures, les co-cultures sont placées dans les conditions de réoxygénation en remplaçant le milieu d'incubation par le milieu de réoxygénation (37°C, 5% CO₂, 95% air, 1g/l de glucose, 15% de serum) pendant 2, 4, 8, 16 et 24 heures (figure 30). Des expériences complémentaires ont consisté à incuber les cellules endothéliales seules lors de la réoxygénation ou alors avec des cellules gliales n'ayant pas été préalablement ischémisées.

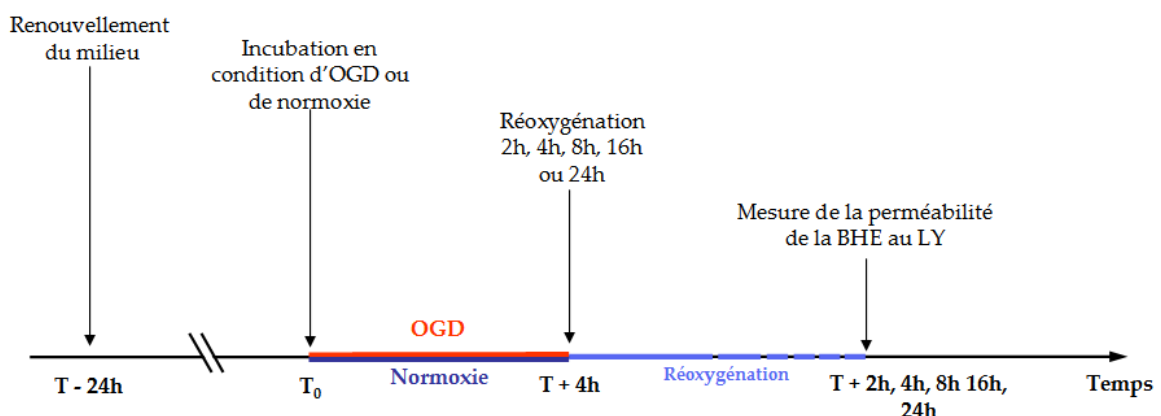


Figure 30 : Synopsis de l'expérimentation d'OGD/reperfusion sur le modèle *in vitro* de BHE murine

Mesure de la perméabilité :

L'intégrité de la BHE est évaluée par la mesure de la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales au jaune Lucifer (Lucifer Yellow CH dilithium (LY), Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), un marqueur d'intégrité de la BHE connu pour ne passer que faiblement au travers des cellules endothéliales. La mesure de la perméabilité consiste à placer les filtres contenant les cellules endothéliales dans une nouvelle plaque contenant 1,5 ml de tampon Ringer-HEPES (NaCl, 150 mM; KCl, 5,2mM; CaCl₂, 2,2 mM; MgCl₂ 6H₂O, 0,2 mM; NaHCO₃, 6 mM; HEPES, 5 mM; glucose 2,8 mM) pour les conditions normoxiques ou post réoxygénation ou une solution de RH sans glucose ni oxygène pour les conditions d'OGD. Après transfert des filtres, 0,5mL de Ringer-HEPES contenant 50µM de LY est placé dans le compartiment luminal. A différents temps (30, 60 minutes) après l'addition du composé marqueur fluorescent, le filtre est transféré dans un autre puits contenant également 1,5mL de Ringer-HEPES (figure 31). Pour chaque condition trois filtres sont utilisés.

Expérience de mesure de la perméabilité

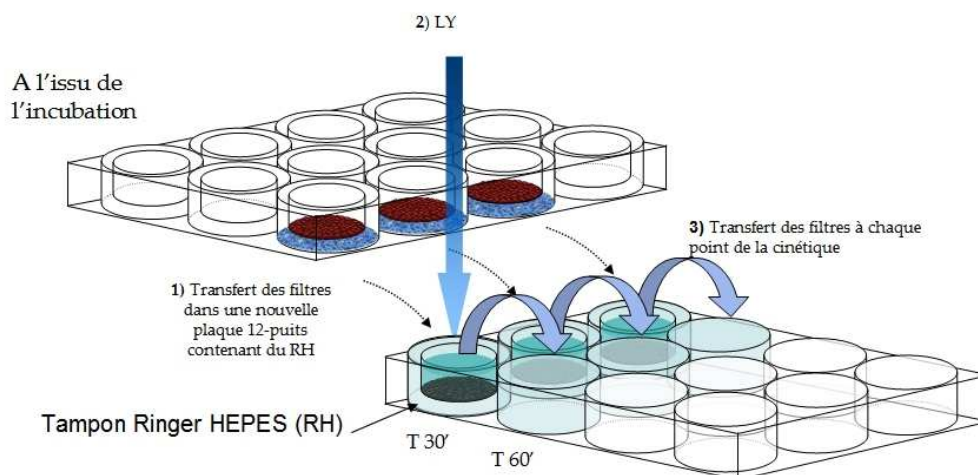


Figure 31: Méthode d'étude de la perméabilité de l'endothélium au LY.

La quantification de la fluorescence est réalisée avec un aliquot de 200µL pour chaque point de chaque compartiment inférieur et 20µL de chaque compartiment supérieur ainsi que la solution initiale (Fluoroskan Ascent FL Thermolabsystems). Le coefficient de perméabilité (Pe) en centimètre par minute est calculé comme décrit précédemment (Dehouck et al. 1992). Dans ce calcul, la perméabilité du filtre (Psf = filtre + matrigel) et celle du filtre avec cellule (Pst = filtre + matrigel + cellules endothéliales) sont prises en compte selon la formule : $1/Pe = 1/Pst - 1/Psf$.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation de la perméabilité \pm SEM comparé à la valeur de 100% de la perméabilité du témoin de normoxie. Les analyses statistiques sont réalisées selon un test non paramétrique, t-test à l'aide du logiciel Prism (Graphpad, San diego, CA, USA).

Dosage des sécrétions gliales présentes dans le milieu

Le dosage du glutamate a été effectué dans des milieux sans sérum issus de l'incubation dans les conditions d'OGD et de réoxygénation à l'aide du réactif Amplex® Red (Molecular probe, Eugene, OR, USA). Ce composé non fluorescent (10-acétyl-3,7-dihydroxyphénazine) forme en présence de peroxidase du raifort (HRP :horseradish peroxidase) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), la résorufine qui est un composé fluorescent. La résorufine absorbe à une longueur d'onde de 571 nm et émet à une longueur d'onde de 585 nm. Cette réaction permet de quantifier de manière sensible les composés impliqués dans une cascade enzymatique dont un des produits est l' H_2O_2 .

Le dosage du glutamate est réalisé suite à la cascade enzymatique suivante :

- 1) Glutamate + $O_2 \rightarrow \alpha$ -cétoglutarate + NH_3 + H_2O_2 (glutamate oxidase)
- 2) H_2O_2 + Amplex® Red \rightarrow resorufin (HRP)

Le dosage est réalisé avec 50 μ L de milieu provenant des compartiments inférieur dans les différentes conditions d'incubation, mélangé 50 μ L de la solution Amplex® Red à 100 μ M contenant 0,2U/mL d'HRP. Le mélange est incubé pendant 30 minutes à 37°C avant la lecture de la fluorescence (Fluoroskan Ascent FL Thermolabsystems). Les résultats sont exprimés en μ M.

Marquage immunocytochimique des protéines de jonction serrée

La visualisation des jonctions serrées par marquage fluorescent de la claudine-5 est réalisée après l'expérience de mesure du transport. Pour cela, les filtres sont rincés au Ringer-HEPES avant la fixation dans un mélange méthanol/acétone (v/v) pendant 1 minute 30. Après trois rinçages au PBS-CMF (Phosphate buffer saline Ca^{2+} Mg^{2+} free) les sites de fixation non spécifique sont saturés lors d'une préincubation de 30 minutes avec une solution de PBS-CMF à 10% SNG (serum normal goat). La protéine d'intérêt ici la claudine-5, est marquée par un anticorps primaire anti-claudine-5 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA) dilué au 1/200^e dans du PBS-CMF 2% SNG incubé pendant une heure à température ambiante. Après trois rinçages avec du PBS-CMF 2% SNG, l'anticorps primaire est reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Alexafluor-488, Molecular Probe, Eugene, OR, USA)

dilué au 1/200^e dans du PBS-CMS 2% SNG et incubé pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont rincées trois fois au PBS-CMF 2% SNG puis au PBS-CMF avant la coloration au Hoechst des noyaux par une incubation de 3 minutes avec du Bis benzimide (Sigma-Aldrich). Les cellules sont rincées à nouveau au PBS-CMF avant le montage entre lame et lamelle au Mowiol contenant du Dabco (Sigma-Aldrich), un agent stabilisateur de la fluorescence. Les marquages fluorescents sont visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica® DMR couplé au logiciel Cool SNAP RS Photometrics camera (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Les montages photo sont réalisés à l'aide du logiciel Adobe Photoshop (Adobe System, San Jose, CA, USA).

Microscopie électronique :

L'analyse de l'ultrastructure de la perméabilité des cellules endothéliales de BHE est réalisée grâce à la technique de microscopie électronique. Suite aux conditions d'OGD et/ou de réoxygénation, les filtres sont transférés dans une nouvelle plaque contenant 1,5mL de Ringer-HEPES dans le compartiment luminal, et 0,5 mL de Ringer-HEPES supplémenté de 0,1mg/mL de wheat germ agglutinin conjugated Horseradich Peroxidase (WGA-HRP, Sigma-Aldrich) dans le compartiment luminal. Après une incubation de 10 minutes (37°C, 5%CO₂, 95% d'air) les cellules sont rincées deux fois avec du Ringer-HEPES et fixées pendant une heure à température ambiante avec une solution de cacodylate 0,1M à 2,5% de glutaraldéhyde (pH 7,4). Après trois rinçages avec une solution de cacodylate de sodium 0,1M la WGA-HRP est mise en contact pendant 5 minutes avec son substrat le 3,3' diaminiobenzidine tétrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich) à 1,5mg/ml solubilisé dans du tampon Tris/HCl 0,05M pH 7,0 à 0,02% H₂O₂. Après trois rinçages dans le tampon cacodylate 0,1M, les cellules sont fixées à nouveau pendant une heure avec le tampon cacodylate 0,1M à 2,5% de glutaraldéhyde. Après trois rinçages avec le tampon cacodylate, les cellules subissent une étape de post fixation afin de stabiliser les lipides avec une solution de cacodylate de sodium 0,1M à 1% de tétraoxyde d'osmium pendant une heure. Ensuite les cellules sont déshydratées afin d'éliminer progressivement l'eau des cellules par des bains successifs de concentration croissante en éthanol (50%, 70%, 95% et 100% d'éthanol). Ensuite l'inclusion des cellules est réalisée dans une résine EPON-812 avant de placer les échantillons dans une étuve à 60°C pendant 72 heures pour la polymérisation de la résine. Les coupes ultrafines (75nm) sont obtenues à partir de la zone centrale du filtre à l'aide d'un ultramicrotome (Leica ultracut UCT ultramicrotome) et recueillis sur des grilles de nickel (EM nickel grids, Agar scientific) recouvertes d'une membrane. Les

coupes sont ensuite contrastées pendant 20 minutes avec une solution d'acétate d'uranyl à 4% puis pendant 5 minutes avec une solution de citrate. Les préparations sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (JEM-1011, Jeol, Japon) équipé d'une caméra digitale (Gatan, modèle 785). Les images sont obtenues à l'aide de logiciel Digital micrograph (Gatan, Pleasanton, CA, USA).

Modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne :

L'ischémie cérébrale focale avec reperfusion est obtenue par la méthode d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne décrite par Zea-Longa (Longa et al. 1989) (figure 32). Après anesthésie à l'hydrate de chloral (300 mg/kg i.p.), une incision est réalisée au niveau de la région cervicale afin d'exposer la bifurcation carotidienne droite. Sous microscope chirurgical (Wild M650, Wild Heerbrugg), la bifurcation carotidienne ainsi que l'artère carotide externe sont disséquées, cette dernière étant ligaturée à son origine. Enfin, la carotide primitive était ligaturée le plus en amont possible de la bifurcation. Dans ces conditions, un micro-clip chirurgical est posé sur la partie proximale de la carotide interne. Une artériotomie est alors réalisée en deçà de la bifurcation afin de permettre le passage d'un fil de nylon chirurgical 6/0 (Dafilon®, Braun) dont l'extrémité est préalablement arrondie à la flamme. Ce filament est sécurisé par une suture sous la bifurcation. Le micro-clip est alors retiré et le fil prudemment avancé dans l'artère carotide interne afin que son extrémité vienne obstruer l'ostium de l'artère cérébrale moyenne, soit une longueur calibrée de 20 mm au-delà de la bifurcation carotidienne. L'extrémité restante du fil de nylon étant disposée soigneusement à l'extérieur de la plaie, l'incision cervicale est refermée puis l'animal replacé en cage. Après 60 minutes, afin de permettre la reperfusion du tissu cérébral ischémié par l'intermédiaire du polygone de Willis, le fil de nylon situé à l'extérieur de la plaie, est délicatement retiré par son extrémité restée à l'extérieur.

Ischémie focale: Occlusion de l'artère cérébrale moyenne

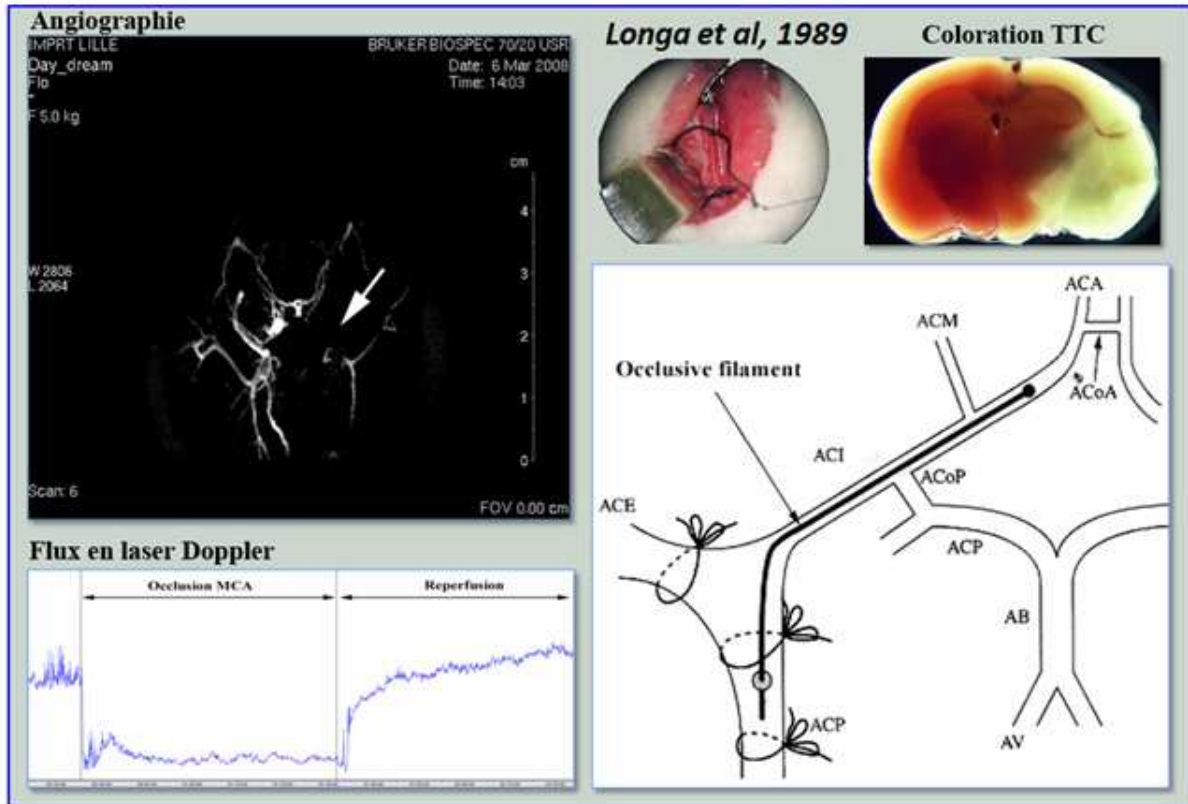


Figure 32 : Modèle d'occlusion intraluminal de l'artère cérébrale moyenne par la carotide interne. ACE: artère carotide externe, ACI: artère cérébrale interne, ACM: artère cérébrale moyenne, ACA : artère cérébrale antérieure, ACoA : artère communicante antérieure, ACoP : artère communicante postérieure, ACP: artère cérébrale primitive, AB : artère basilaire, AV : artère vertébrale. La coloration du tissu sain est réalisée à l'aide d'une coloration TTC (2'3'5'-triphényl-tétrazolium chloride).

L'angiographie permet de visualiser l'arrêt de la circulation dans l'artère cérébrale moyenne lors de l'occlusion. De plus, la mesure du flux sanguin par laser doppler permet de contrôler l'arrêt du flux sanguin lors de l'occlusion et le retour à un flux normal équivalent au flux initial suite au retrait du fil correspondant à la reperfusion.

Mesure des paramètres physiologiques :

Lors de l'ensemble des procédures chirurgicales, la température des animaux est maintenue à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ à l'aide d'une table chauffante puis avec une lampe chauffante jusqu'au réveil complet de l'animal. Une surveillance des paramètres physiologiques (pression artérielle et gaz du sang) est par ailleurs réalisée. Les mesures de pression artérielle (transducteur Satham, Gould USA ; moniteur de pression artériel micromed 2654) et les prélèvements pour les gaz du sang (tube capillaire et appareil de mesure Stat profile Ultra, Nova Biomedical) sont réalisés après cathétérisme de l'artère caudale.

Technique d'imagerie par résonance magnétique :

Après 2, 4, 8, 24, 48 et 72 heures de reperfusion les lésions cérébrales sont visualisées à l'aide d'un imageur de 7T (Biospec, Bruker BioSpin, Wissemburg, Germany) muni d'un résonateur de type "birdcage" diamètre 55 mm couplé à une antenne de surface quadratique optimisant la réception des signaux du cerveau. Les animaux sont anesthésiés pendant toutes les acquisitions *via* un masque intégré au berceau permettant la diffusion d'air à raison de 0,8 l/min mélangé à 0,75% d'isoflurane.

Les images anatomiques étaient pondérées en T2 selon la séquence RARE (fast spin echo rapid acquisition relaxation enhanced) avec les paramètres suivants: TR = 5 s, TE effectif = 150 ms, une matrice de 256 x 256 et une FOV = 2 x 2 cm. 20 coupes axiales de 0,5 mm d'épaisseur permettaient de couvrir l'ensemble du cerveau. La lésion pondérée T2 est segmentée en utilisant les bibliothèques de calcul ITK intégrée à un logiciel freeware ITKsnap. Les reconstructions 3D permettent de quantifier les volumes des lésions en mm³. La segmentation est effectuée manuellement pour éviter les débordements ventriculaires.

Mesure du coefficient apparent de diffusion de l'eau (ADC : apparent diffusion coefficient) :

La séquence de diffusion fait partie du bilan de base en neuroradiologie pour l'exploration de l'encéphale. Elle permet en complément des techniques d'imageries conventionnelles d'évaluer le mouvement des molécules d'eau qui peut être modifié en cas de processus pathologique. A partir des séquences de diffusion, le degré de mobilité des molécules d'eau peut être évalué quantitativement grâce au coefficient de diffusion apparent (ADC) exprimé en $\mu\text{m}^2/\text{sec}$. Ce coefficient traduit le degré de mobilité des molécules d'eau.

La figure 33 présente les clichés anatomiques mesurés en T2 corrélés avec une carte d'ADC. Le premier suivi démontre à 24h de reperfusion qu'une lésion visible en T2 se traduit sur la carte d'ADC par une chute de cette valeur correspondant à une diminution de la mobilité des molécules d'eau. Cette chute pourrait correspondre à des modifications hydriques, telle qu'une évolution de l'eau extracellulaire et le gonflement intracellulaire. Le suivi au cours des 2 premiers mois permet d'observer ce type de variations du coefficient de diffusion qui sont prédictives des lésions constituées que l'on observe généralement par une méthode anatomique pondérée T2. Les valeurs d'ADC ne sont pas constantes dans le temps pour une lésion stable constituée visible en T2. Ces variations correspondent à différents degrés de mobilité des molécules d'eau et pourraient correspondre soit à de l'eau confinée qui a perdu sa mobilité (diminution du coefficient) soit à un degré de liberté plus grand (augmentation du coefficient)

pouvant correspondre à de l'eau libre pour les ADC les plus hauts. On peut apparenter ces variations aux événements post-ischémiques tels que le gonflement cellulaire, l'œdème cytotoxique ou encore l'œdème vasogénique.

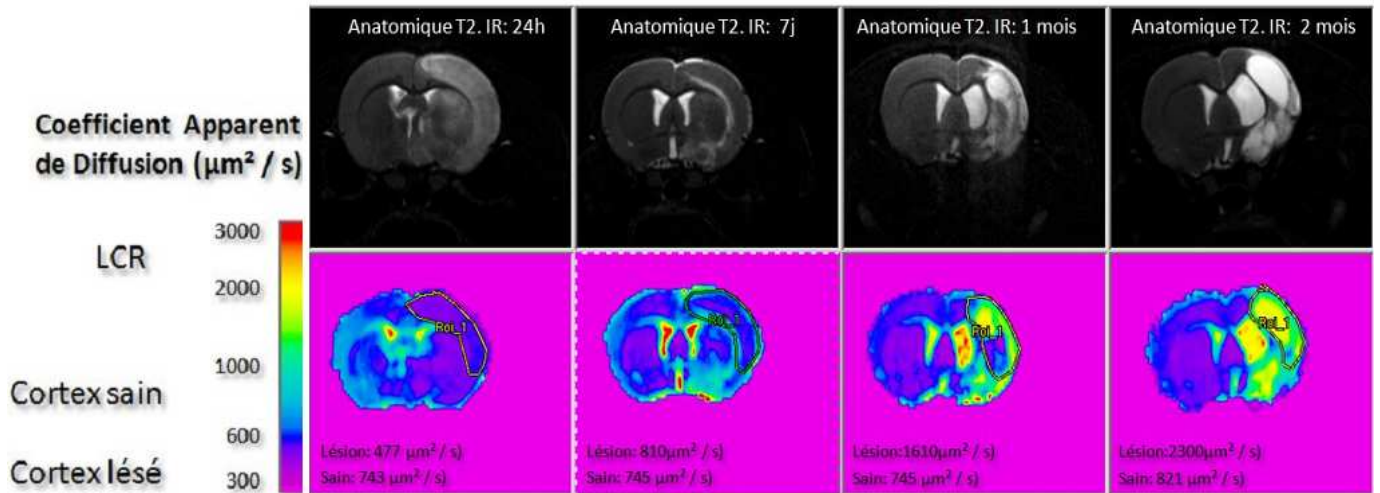


Figure 33 : Principe d'analyse de la cartographie ADC corrélée avec des clichés anatomiques T2. Les images obtenues chez le rat suite à l'ischémie reperfusion pour un suivi de 24h à 2 mois.

III.3 Résultats et discussion

III.3.1 La BHE présente un profil de perméabilité multiphasique lors de l'OGD-réoxygénation.

Afin de simuler les conditions ischémiques *in vivo* d'ischémie/reperfusion, le modèle *in vitro* de co-culture a été incubé dans des conditions d'OGD/réoxygénation. Dans ces conditions, l'incubation en OGD correspond à un environnement appauvri en glucose et en oxygène, il mime la phase d'occlusion durant laquelle l'arrêt du flux sanguin fait chuter les taux de glucose et d'oxygène. Cette incubation est suivie par une période de réoxygénation qui correspond à un environnement normal comprenant 1g/l de glucose et équilibré avec l'air atmosphérique, elle mime la reperfusion lors de laquelle le flux sanguin cérébral est rétabli. L'incubation de la co-culture en OGD est connue pour moduler la perméabilité de la BHE. En effet, une incubation de quatre heures induit une première augmentation significative (750%) de la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales au LY (figure 34), une molécule non diffusible connue pour ne passer que très faiblement au travers des cellules endothéliales de BHE et ainsi utilisée comme marqueur d'intégrité. Ce résultat est en accord avec les précédentes études menées sur les modèles murin et bovin pour lesquelles l'incubation de la co-culture dans les conditions d'OGD induit une augmentation de la perméabilité au LY et au saccharose radiomarqué (Brillault et al. 2002; Culot et al. 2009; Mysiorek et al. 2009). Suite à cette première phase d'augmentation, la mesure de la perméabilité endothéliale lors des vingt-quatre heures de réoxygénation montre un profil multiphasique (figure 34).

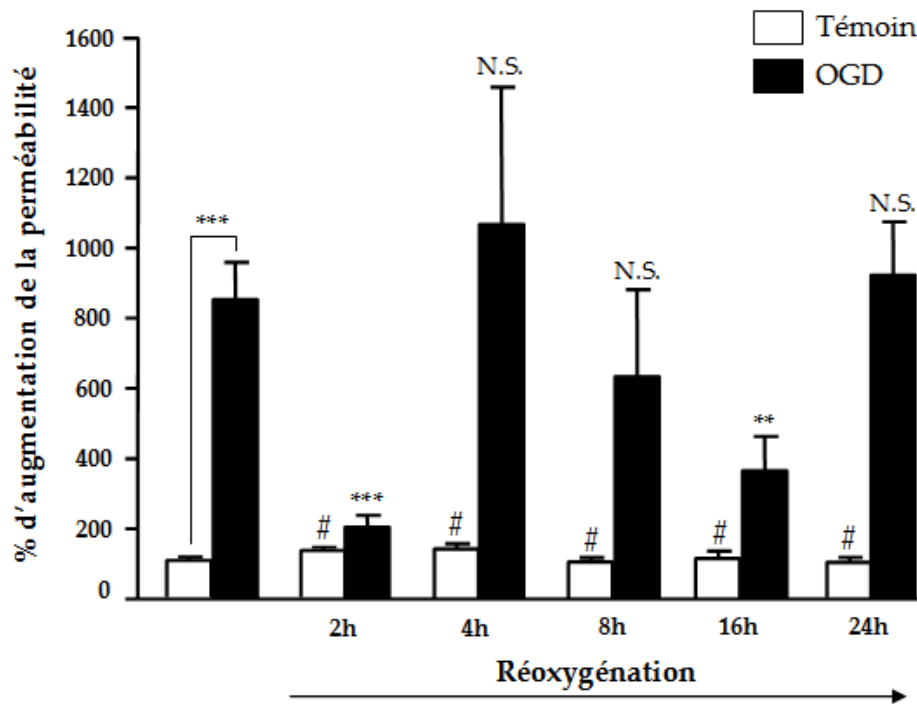


Figure 34 : Evolution de la perméabilité des cellules endothéliales au LY lors de l'OGD-réoxygénation.

Les histogrammes représentent les moyennes avec écart type du pourcentage d'augmentation de la perméabilité au LY de la monocouche de cellules endothéliales en normoxie ou OGD suivi ou non de 2h, 4h, 8h, 16h ou 24h de réoxygénation. La valeur de contrôle de 100% correspond à un coefficient de perméabilité au LY de $0,29 \cdot 10^{-3}$ cm/min obtenu après 4 heures de conditions normoxiques. Les valeurs moyennes étaient significatives suite à un t-test *vs* la condition OGD ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, N.S. : Non Significatif (n= 9 monocouches de cellules endothéliales/condition) Les changements de milieu de culture pendant la réoxygénation n'ont pas modifié la perméabilité des témoins en condition de normoxie (#).

En effet, dès 2 heures de réoxygénation la perméabilité est réduite de 77% comparée à la condition d'OGD. Cette forte diminution est suivie par une nouvelle phase d'augmentation significative de la perméabilité à 4h (930%) qui semble être légèrement réduite à 8h et 16h pour retrouver à 24h une intensité élevée (759%). Parallèlement, les contrôles dans les conditions normoxiques à chaque temps de réoxygénation ne montrent pas de modification de la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales (figure 34).

Cette expérience démontre un profil de perméabilité de la BHE multiphasique avec plusieurs points de la cinétique de réoxygénation qui se distinguent. Le premier apparaît de manière précoce, dès 2h de réoxygénation où la perméabilité endothéliale restreinte traduit une récupération rapide de l'endothélium. Le second apparaît plus tardivement, à 24h de réoxygénation lorsque la perméabilité est fortement augmentée suggérant de nouveau une dysfonction de l'endothélium. Il est intéressant de noter pour la seconde phase de diminution, la perméabilité à 16h bien que diminuée est deux fois supérieure à celle mesurée à 2h, avec un

coefficient de perméabilité de $Pe = 1,2 \cdot 10^{-3}$ cm/min, ce qui est dans le laboratoire attribué à une barrière perméable (Culot et al. 2008).

Le profil de perméabilité de la BHE lors de la cinétique de réoxygénation est en accord avec des études *in vivo* qui montrent une diminution précoce de la perméabilité de la BHE suite à la reperfusion, suivie d'une période réfractaire avant une augmentation plus tardive de la perméabilité vasculaire (Kuroiwa et al. 1985; Belayev et al. 1996; Rosenberg et al. 1998; Huang et al. 1999). Le point 24h de la cinétique pourrait correspondre alors à la formation de l'oedème qui atteint généralement son maximum dans les 24h à 48h suivant le début de l'ischémie (Rosenberg 1999; Gasche and Copin 2003).

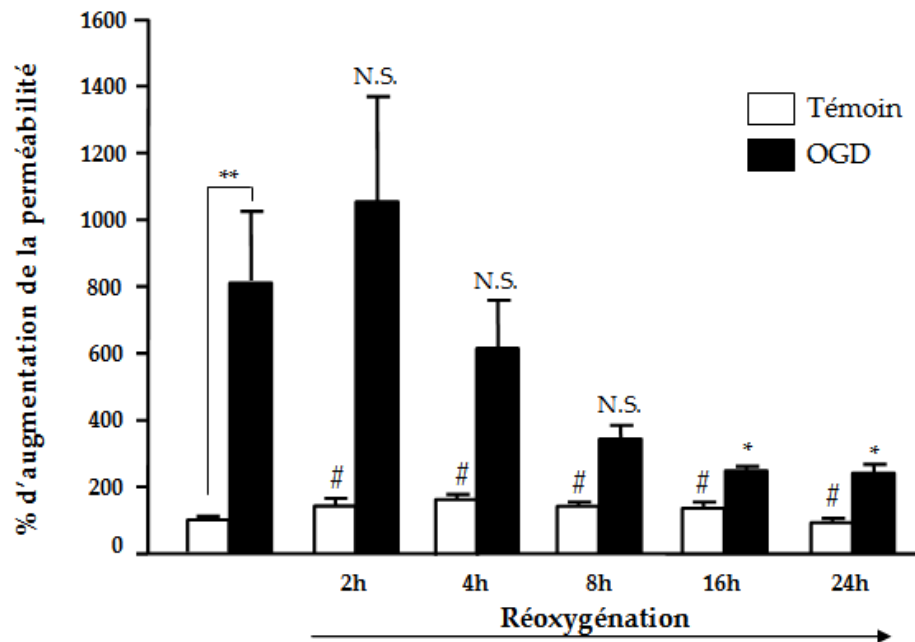
III.3.2 Le profil d'augmentation de la perméabilité de la BHE lors de la réoxygénation dépend des cellules gliales.

L'implication des cellules gliales sur l'augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales lors de l'OGD a été démontrée dans des études précédentes utilisant le modèle bovin et le modèle murin de BHE développés au laboratoire. En effet aucune augmentation de la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales n'a été mesurée lorsque celle-ci est incubée dans les conditions d'OGD en absence de cellules gliales (Brillault et al. 2002; Culot et al. 2009).

Afin de déterminer le rôle des cellules gliales sur la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales lors de la réoxygénation, les cellules endothéliales ont été incubées en absence de cellules gliales. Pour ce faire, après incubation de la co-culture en OGD, l'insert comportant les cellules endothéliales a été transféré au dessus d'un puits vide. Dans ces conditions, suite à la première phase d'augmentation significative de la perméabilité endothéliale (709%) induite par les 4h d'OGD, la perméabilité des cellules endothéliales seules lors de la réoxygénation présente un profil monophasique (figure 35A). Après deux heures de réoxygénation, la perméabilité endothéliale reste élevée et augmentée de 905% comparée à la valeur du témoin. Cependant, dès quatre heures de réoxygénation, la perméabilité diminue progressivement jusqu'à 24h de réoxygénation (figure 35A).

Ce résultat montre que le profil biphasique de perméabilité des cellules endothéliales observé lors de la réoxygénation dépend de la présence des cellules gliales.

A



B

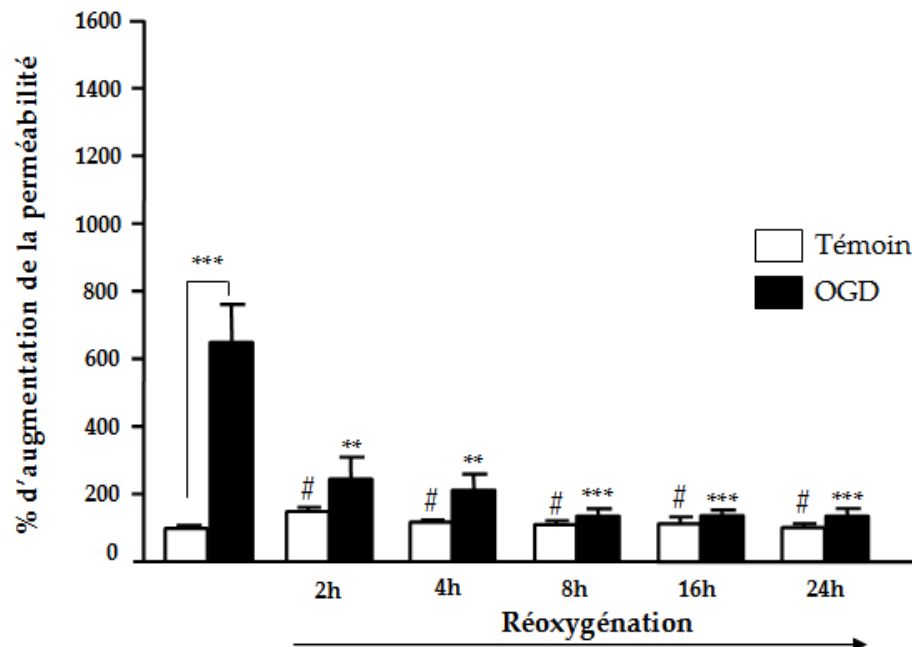


Figure 35 : Evolution de la perméabilité des cellules endothéliales lors de la réoxygénation en absence de cellules gliales (A) ou en présence de cellules gliales non ischémisées (B).

Les histogrammes représentent les moyennes avec écart type du pourcentage d'augmentation de la perméabilité au LY de la monocouche de cellules endothéliales en normoxie ou OGD suivi ou non de 2h, 4h, 8h, 16h ou 24h de réoxygénation, en absence de cellules gliales lors de la réoxygénation la valeur de contrôle de 100% correspond à un coefficient de perméabilité au LY de $0,34 \cdot 10^{-3}$ cm/min obtenu après 4 heures de conditions normoxiques (n= 6 monocouches de cellules endothéliales/condition) (A) ou en présence de cellules gliales non ischémisées lors de la réoxygénation (B). La valeur de contrôle de 100% correspond à un coefficient de perméabilité au LY de $0,24 \cdot 10^{-3}$ cm/min obtenu après 4 heures de conditions normoxiques (n= 9 monocouches de cellules endothéliales/condition). Les valeurs moyennes étaient significatives suite à un t-test *vs* la condition OGD *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 N.S. : non significatif. Les changements de milieu de culture pendant la réoxygénation n'ont pas modifié la perméabilité des témoins en condition de normoxie (#).

D'autre part, la même expérience a été menée mais cette fois-ci en plaçant, lors de la réoxygénation, l'insert comportant les cellules endothéliales au dessus d'un puits contenant une

Etude de la réoxygénation sur la BHE ischémisée

culture de cellules gliales n'ayant pas subi d'OGD. Ainsi, suite à une augmentation significative de la perméabilité (558%) induite par 4h d'incubation de la co-culture en OGD, la perméabilité des cellules endothéliales est réduite de 60% dès 2h de réoxygénation en présence des cellules gliales non ischémisées. Cette restriction de perméabilité est conservée jusqu'à 24h de réoxygénation (figure 35B).

Ainsi les cellules gliales non ischémisées induisent une récupération fonctionnelle rapide de l'endothélium, dès deux heures de réoxygénation et qui persiste jusqu'à vingt quatre heures de réoxygénation. Ces résultats démontrent que le profil de perméabilité endothéliale dépend à la fois de la présence des cellules gliales mais également de leur réponse à l'OGD. De plus, les cellules endothéliales seules sont capables de récupérer en terme de perméabilité, mais un temps plus long est nécessaire afin d'atteindre une perméabilité équivalente au témoin de normoxie. Dans ces conditions, nous n'observons pas de profil de perméabilité biphasique.

Afin de d'estimer l'atteinte des cellules gliales suite au stress de l'OGD, nous avons réalisé un test de viabilité par marquage des noyaux à l'aide de deux intercalants, le bizbenzimidazole (Hoescht) qui marque les noyaux des cellules viables (en bleu), et l'iodure de propidium (IP) qui traverse uniquement les membranes des cellules en nécrose (en rouge). La visualisation du marquage témoin indique une population de cellules gliales viables pour le témoin de normoxie (figure 36A). Cependant, suite à l'OGD et à la réoxygénation on observe un décollement d'une partie des cellules gliales ainsi qu'une proportion importante de cellules marquées à l'IP indiquant une nécrose de ces cellules (figure 36B).

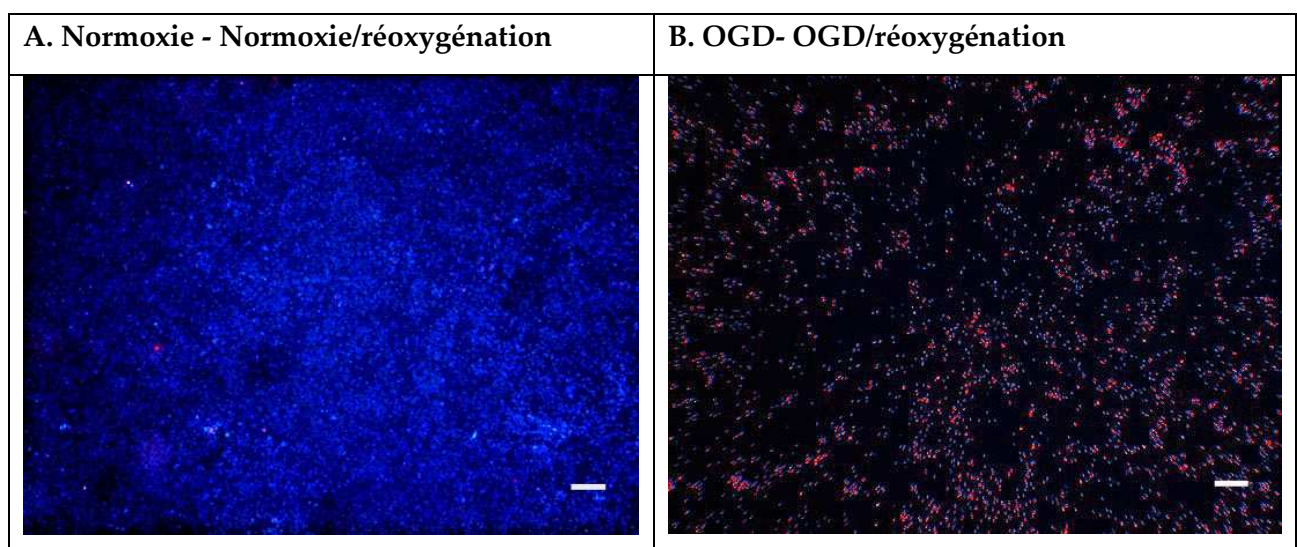


Figure 36 : Etude de viabilité des cellules gliales par marquage des noyaux au hoescht/IP. Bar=25µm.

Ce marquage a été corrélé avec une méthode d'analyse quantitative, par dosage de la LDH (lactate deshydrogénase) dans les milieux d'incubation. La concentration de cette enzyme dans la condition témoin est de 1% alors qu'elle augmente à 70% en OGD. Le stress de l'OGD provoque donc la perméabilisation des membranes des cellules gliales traduisant la mort des cellules par nécrose. Cependant, des expériences complémentaires ont été réalisées afin de savoir si le relargage du contenu cytosolique glial dans le milieu était la cause de l'augmentation de perméabilité endothéliale. Pour cela, les cellules endothéliales ont été incubées en présence d'un lysat cellulaire provenant de cellules gliales préalablement incubées en normoxie ou en OGD (figure 37).

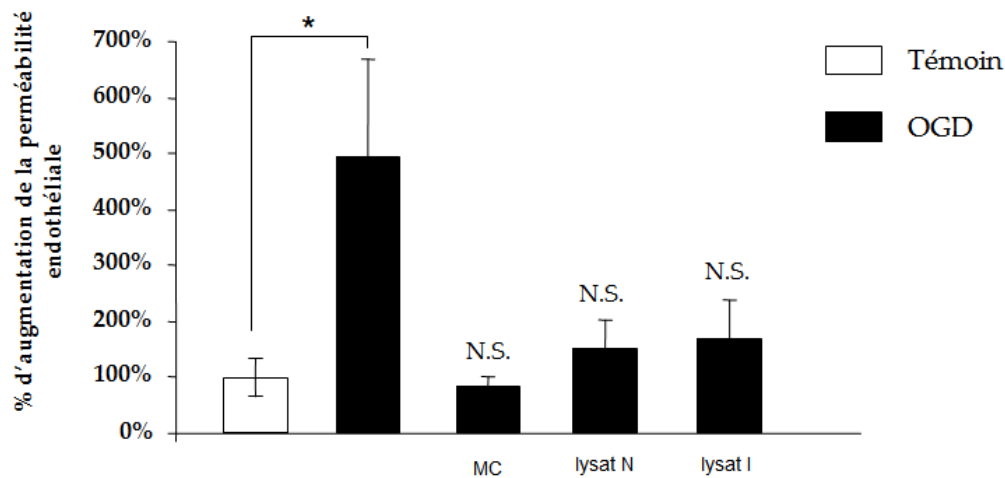


Figure 37 : Etude de l'augmentation de la perméabilité endothéliales par le milieu conditionné et le lysat de cellules gliales ischémisées (lysat I) ou non ischémisées (lysat N).

Les histogrammes représentent les moyennes avec écart type du pourcentage d'augmentation de la perméabilité au LY de la monocouche de cellules endothéliales en normoxie ou OGD. La valeur de contrôle de 100% correspond à un coefficient de perméabilité au LY de $0,29 \cdot 10^{-3}$ cm/min obtenu après 4 heures de conditions normoxiques. Les valeurs moyennes étaient significatives suite à un t-test *vs* la condition OGD * $p < 0,05$, N.S.: Non Significatif (n= 3 monocouches de cellules endothéliales/condition) MC : milieu conditionné.

Aucune augmentation de la perméabilité n'a été mesurée dans ces conditions. Ainsi, bien que la mort des cellules gliales soit importante, elle ne semble pas être la cause des dommages endothéliaux. De plus, l'utilisation de milieu conditionné de cellules gliales ischémisées, n'a pas induit d'augmentation de perméabilité. Ce résultat suggère que les cellules endothéliales doivent être sensibilisées au stress de l'OGD pour répondre aux facteurs sécrétés dans le milieu par les cellules gliales comme démontré sur le modèle bovin (Brillault et al. 2002). L'augmentation de la perméabilité endothéliale résulte ainsi de l'intercommunication entre les cellules gliales et endothéliales et dépendrait, dans notre modèle, de facteurs sécrétés dans le milieu en raison de l'absence de contact direct entre ces deux types cellulaires.

Une première approche quantitative d'identification d'un acteur potentiel de cette hyperperméabilité, nous a permis de doser la concentration de glutamate présente dans le milieu lors de l'OGD pour certains points de la cinétique de réoxygénation. Cette expérience pour laquelle nous avons obtenu le même profil de perméabilité, a été réalisée sans sérum dans le milieu de réoxygénation afin d'éviter les interactions avec la technique de dosage (figure 38).

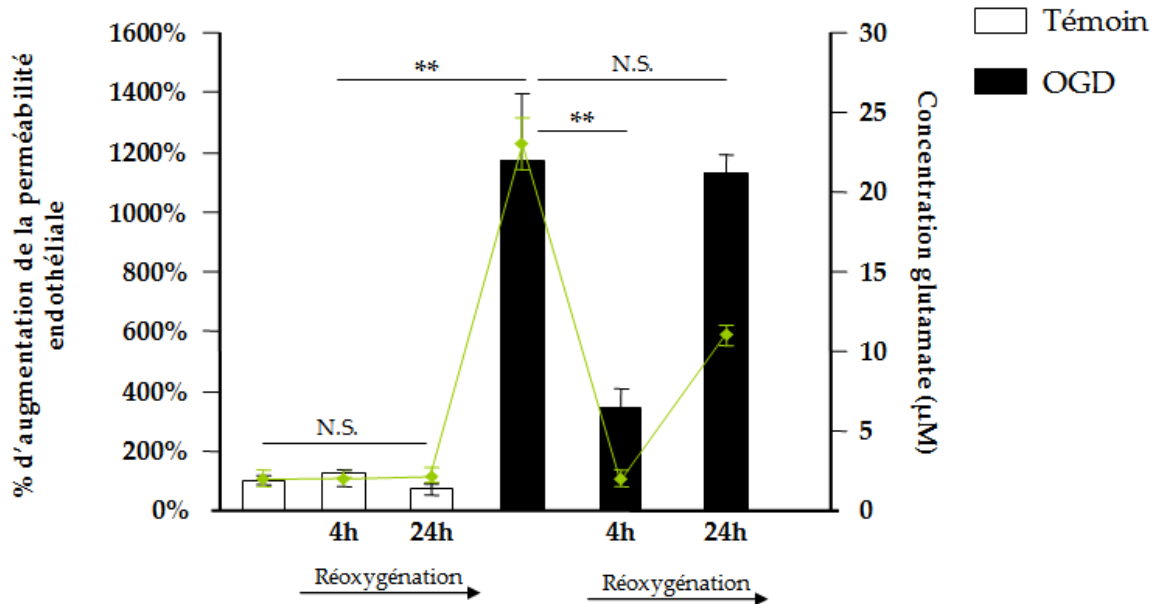


Figure 38 : Graphique de corrélation de la perméabilité endothéliales et le dosage du glutamate.

Les histogrammes représentent les moyennes avec écart type du pourcentage d'augmentation de la perméabilité au LY de la monocouche de cellules endothéliales en normoxie ou OGD suivi ou non de 4h ou 24h de réoxygénation. La valeur de contrôle de 100% correspond à un coefficient de perméabilité au LY de $0,31.10^{-3}$ cm/min obtenu après 4 heures de conditions normoxiques. Les valeurs moyennes étaient significatives suite à un t-test vs la condition OGD $**p < 0,01$, N.S. : Non Significatif (n= 3 monocouches de cellules endothéliales/condition). La courbe représente la variation de concentration de glutamate (en µM) mesurée dans les milieux de sécrétion des cellules gliales.

Ainsi nous avons pu mesurer une augmentation significative de la concentration de glutamate dans les conditions d'OGD ($23 \mu\text{M} \pm 1,64$) comparé au témoin de normoxie ($2\mu\text{M} \pm 0,54$). Cette concentration diminue en même temps que la diminution de perméabilité lors de la réoxygénation et atteint des concentrations identiques à celle mesurée dans les conditions témoin ($2\mu\text{M} \pm 0,51$) alors que celle-ci augmente à nouveau lors des augmentations de perméabilité lors de la réoxygénation ($11 \mu\text{M} \pm 0,6$).

Ce premier dosage montre une variation périodique corrélée aux variations de perméabilité endothéliale lors de l'OGD/réoxygénation. Cependant une approche plus globale est nécessaire dans l'analyse du contenu du milieu en sécrétions gliales responsables de l'augmentation de la perméabilité. Un effet perméabilisant du glutamate sur la BHE a été montré dans plusieurs études. Son mécanisme d'action impliquerait le NO (Mayhan and Didion 1996). Cependant le

dosage du NO dans nos conditions expérimentales a montré des résultats variables et inexploitable suggérant un effet indépendant du NO. Une étude *in vivo* suggère l'implication du récepteur glutamatergique métabotropique (Liu et al. 2004).

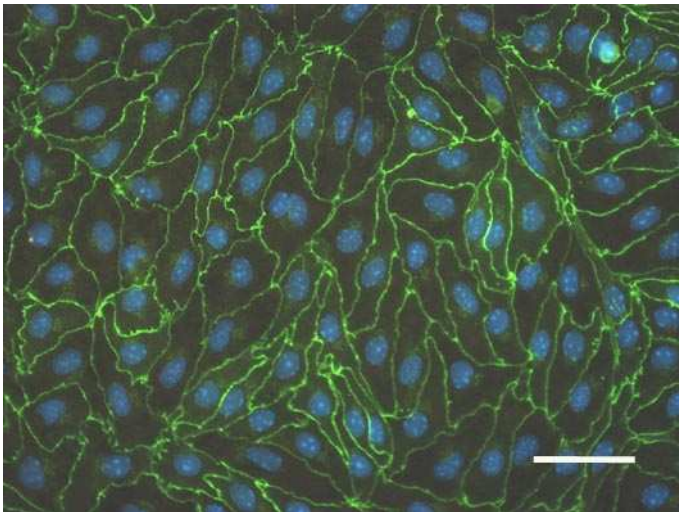
Ces expériences démontrent l'importance des communications entre les cellules gliales et les cellules endothéliales. Ainsi le profil biphasique l'augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales observée lors de la réoxygénation semble dépendre essentiellement des communications inter cellulaires entre les cellules gliales et les cellules endothéliales. De plus, la réponse de l'endothélium dépend également de la viabilité des cellules gliales puisque les cellules gliales non ischémisées ne provoquent pas ce profil biphasique mais la récupération rapide d'une faible perméabilité endothéliale. Il existe alors une intercommunication essentielle entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires décrite dans les conditions physiologiques pour l'établissement des propriétés de la BHE mais qui apparaît ici dans les conditions pathologiques en réponse au stress. Celle-ci résulte de l'intégration d'une communication complexe entre les cellules endothéliales et les cellules gliales périvasculaires. Ces résultats mettent en avant la nécessité d'intégrer la réponse des autres cellules de l'unité neurovasculaire pour l'étude de la dysfonction de la BHE et suggère que l'état des cellules gliales est un paramètre important dans la capacité de récupération de la BHE, qui pourrait être différente selon la sévérité de la lésion dans les différentes zones touchées du cerveau. D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer ce résultat et mieux comprendre ces interactions.

III.3.3 L'augmentation multiphasique de la perméabilité endothéliale implique une modulation de la fonction des jonctions serrées.

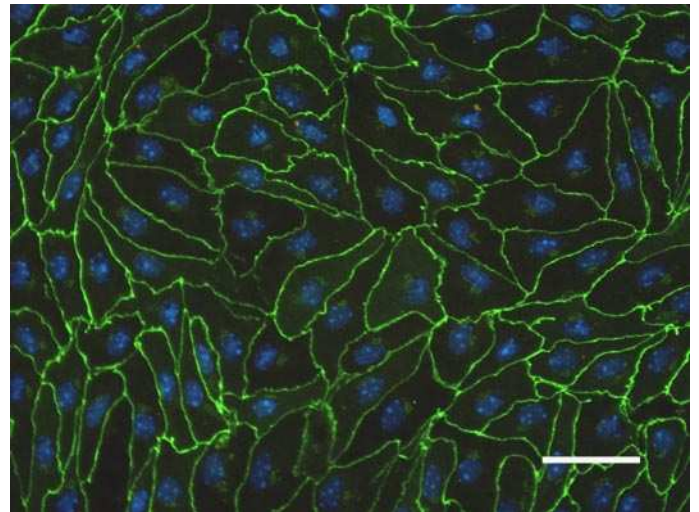
La modulation de la perméabilité de la BHE lors de l'ischémie mais également lors de la réoxygénation semble dépendre essentiellement de la présence des cellules gliales mais également de leur viabilité. Nous nous sommes intéressés à deux points de la cinétique qui se distinguent, le premier est à 2h de réoxygénation pour lequel on observe une diminution rapide de la perméabilité endothéliale, le second est plus tardif, il correspond au point 24h pour lequel on observe une augmentation exacerbée de la perméabilité (figure 34) alors qu'en présence de cellules gliales non ischémisées, la perméabilité est restreinte à ce temps tardif (figure 35B). Afin d'identifier les mécanismes cellulaires responsables de la dysfonction vasculaire lors de la réoxygénation, nous avons entrepris une analyse des jonctions serrées par marquage

Etude de la réoxygénation sur la BHE ischémisée
immunocytochimique sur ces temps particuliers de la réoxygénation. La visualisation de l'intégrité des jonctions serrées en microscopie photonique montre pour les témoins en normoxie, une localisation continue à la périphérie des cellules endothéliales d'une protéine des jonctions serrées, la claudine-5 (figure 39A à 39E). Dans les conditions pathologiques, la visualisation des jonctions serrées par cette technique ne révèle pas de rupture visible de ces jonctions en OGD (figure 8F) ainsi que pour le temps précoce d'OGD/réoxygénation de 2h (Figure 39G et 39H) et le temps tardif d'OGD/réoxygénation 24h avec les cellules gliales non ischémisées (figure 39J). Cependant, on observe une perte d'intégrité de ces jonctions en OGD/réoxygénation 24h lorsque les cellules gliales sont ischémisées (figure 39I). La localisation des points de rupture est indiquée par les flèches.

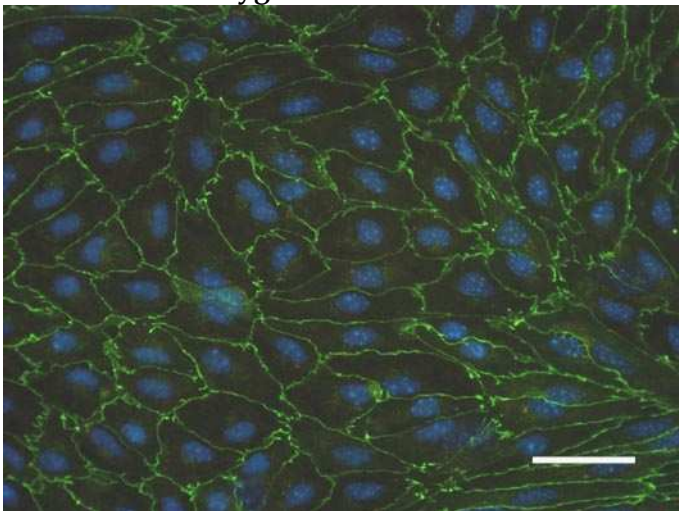
A. Normoxie



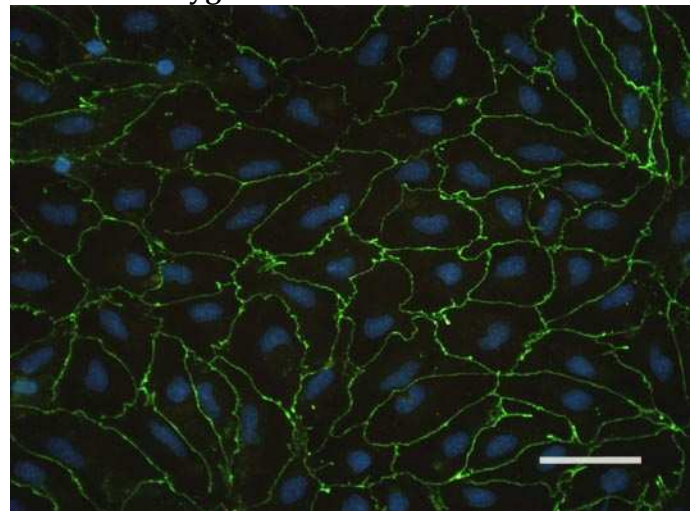
F. OGD



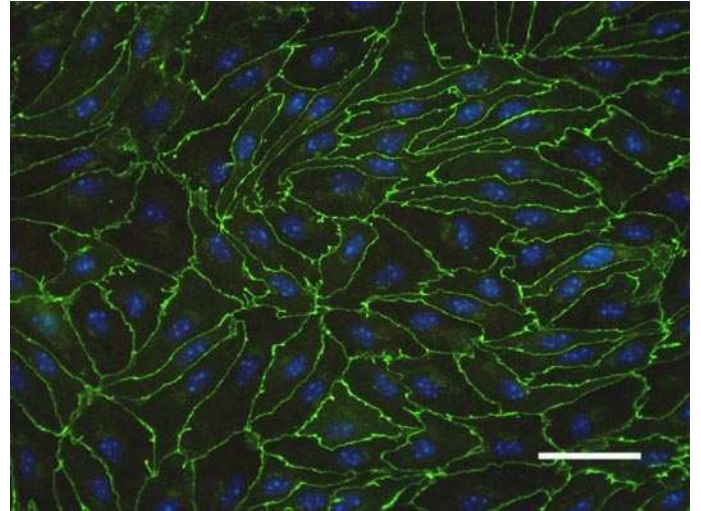
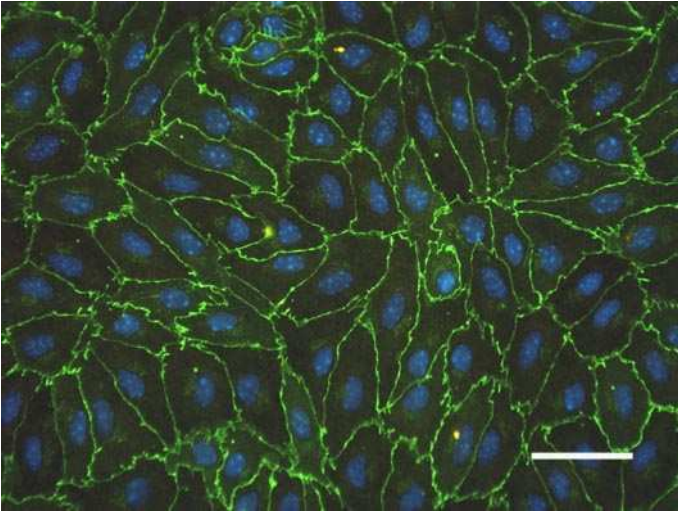
B. Normoxie/réoxygénation 2h



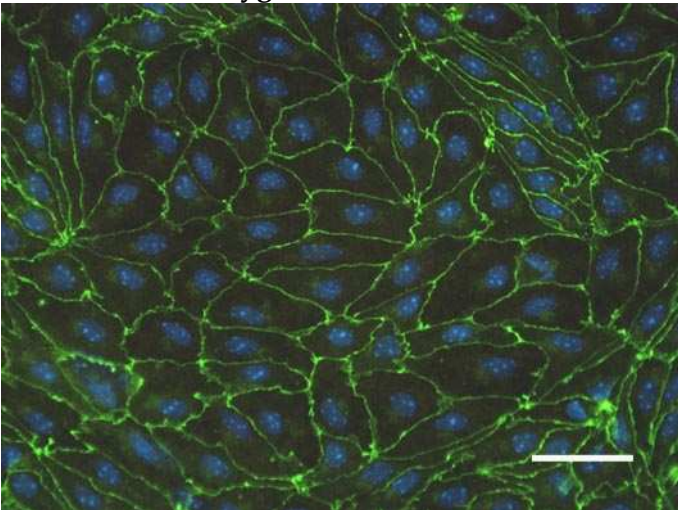
G. OGD/réoxygénation 2h



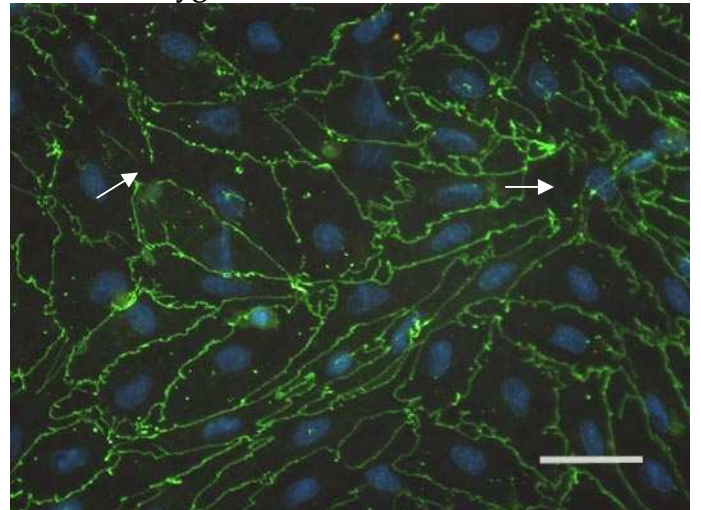
C. Normoxie/réoxygénation 2h avec cellules gliales non ischémiques



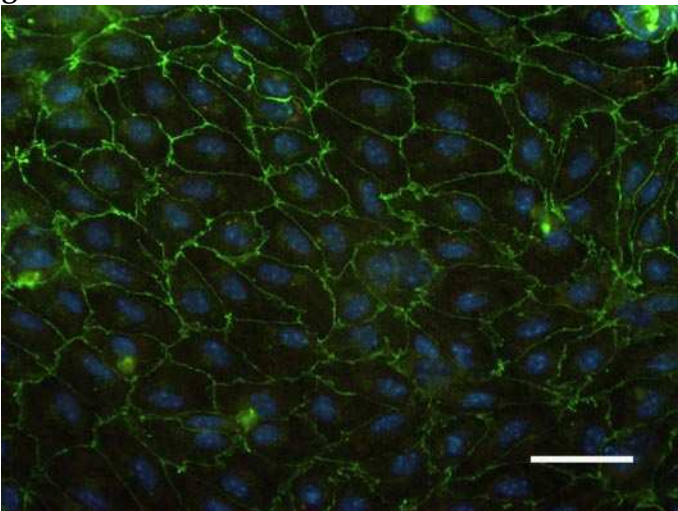
D. Normoxie/réoxygénation 24h



I. OGD/réoxygénation 24h



E. Normoxie/réoxygénation 24h avec cellules gliales non ischémiques



J. OGD/réoxygénation 24h avec cellules gliales non ischémiques

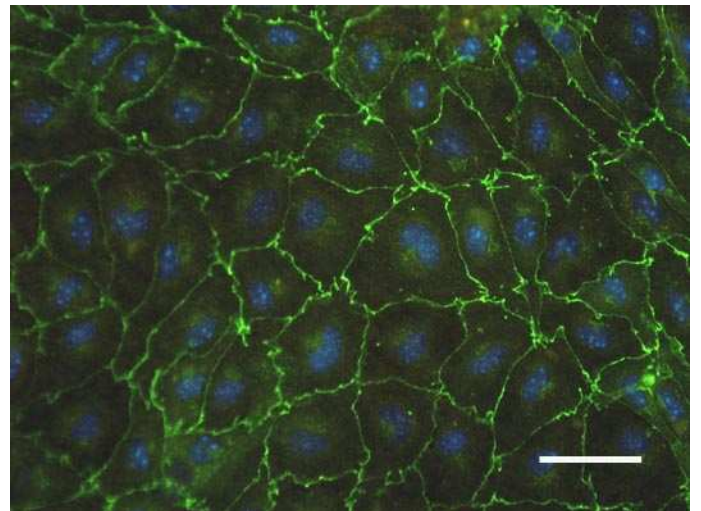


Figure 39 : Localisation d'une protéine de jonctions serrées, la claudine-5 au sein d'une monocouche de cellules endothéliales. Localisation de la claudine-5 dans les conditions témoin de normoxie (A à E) ainsi que dans les conditions d'OGD (F à J) avec ou sans réoxygénation (barre= 50µm) Les flèches indiquent les zones de rupture de l'intégrité des jonctions serrées.

Ces résultats démontrent que les modulations de la perméabilité endothéliale peuvent apparaître sans rupture visible des jonctions serrées, suite à l'observation en microscopie photonique à fluorescence de la claudine-5. En effet, l'OGD ne montre pas de rupture visible des jonctions serrées alors que la perméabilité est fortement augmentée. De plus, lors du temps de réoxygénation précoce de 2h, aucune différence concernant l'intégrité des jonctions serrées de la monocouche de cellules endothéliale n'est observée entre les conditions témoins et les conditions pathologiques. Cependant, on observe à l'issue de 24h de réoxygénation une rupture visible des jonctions serrées dans la condition pathologique (figure 39I). Cette observation suggère une évolution de la dysfonction endothéliale visible au niveau des jonctions serrées. La gradation des mécanismes délétères aboutit à une rupture importante des jonctions serrées. Des études sont encore nécessaires pour rechercher les éventuelles modifications dans les interactions entre les protéines du complexe jonctions serrées comme rapporté dans de précédentes études sur la claudine-5 (Koto et al. 2007), ou encore ZO-1 et ZO-2 (Mark and Davis 2002).

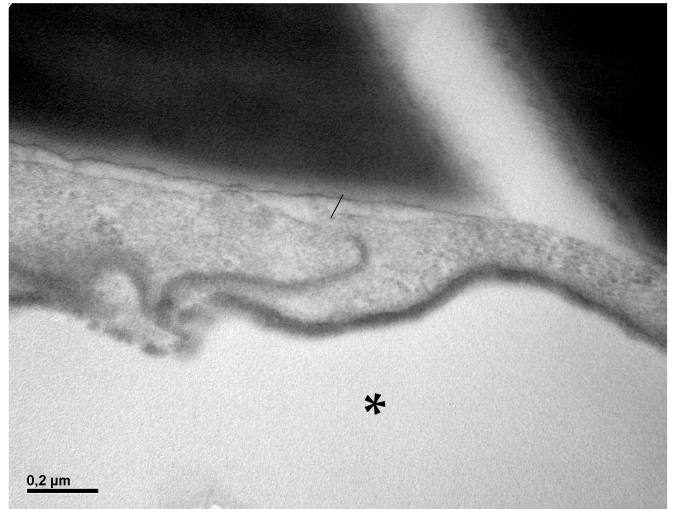
De plus, ces mécanismes délétères semblent être dépendants de la viabilité des cellules gliales puisqu'en présence de cellules gliales non ischémisées aucune rupture des jonctions n'est observée (figure 39J). Les cellules gliales non ischémisées sont capables de maintenir la faible perméabilité des cellules endothéliales à l'issue de 24h de réoxygénation avec également une préservation apparente de l'intégrité des jonctions serrées intercellulaires. La rupture visible des jonctions serrées dans la condition pathologique montre que les cellules gliales sont également capables d'induire des mécanismes délétères induisant la rupture de ces jonctions.

Cependant, bien que la microscopie photonique à fluorescence permette de visualiser la rupture physique de la BHE, l'absence de rupture n'exclut pas une régulation fine de sa structure lorsque la perméabilité endothéliale est augmentée.

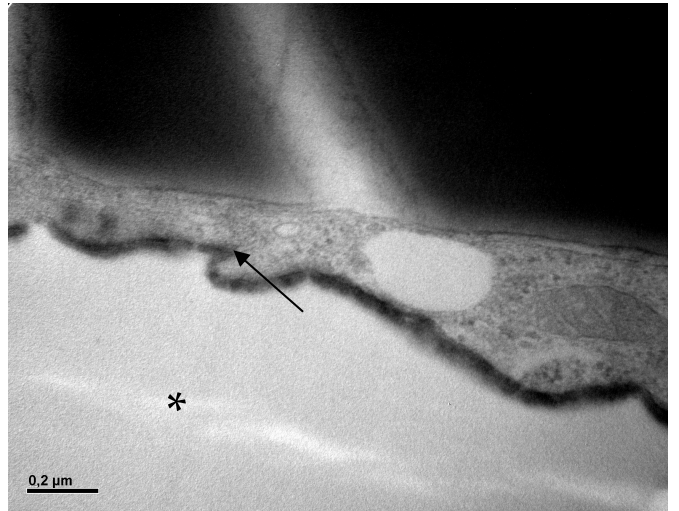
III.3.4 Etude de l'ultrastructure des jonctions serrées lors de l'OGD/réoxygénation

Afin d'obtenir des informations plus précises sur les jonctions serrées nous avons étudié leur ultrastructure en utilisant la technique de microscopie électronique à transmission afin de visualiser le passage de la WGA-HRP (wheat germ agglutinin-horseradich peroxidase) qui est une lectine de blé couplée à la peroxydase du raifort incapable de diffuser au travers des jonctions serrées lorsque celles-ci sont intactes et imperméables (figure 40). Cependant, elle peut atteindre la face abluminale des cellules endothéliales lorsque les jonctions serrées intercellulaires deviennent perméables. La visualisation de l'ultrastructure des jonctions serrées pour les témoins en normoxie suivie ou non d'une période de réoxygénation montre un passage paracellulaire de la WGA-HRP uniquement au niveau du petit sillon présent au dessus de la zone de la membrane plasmique qui forme une jonction serrée entre deux cellules endothéliales. Dans ces conditions, les jonctions serrées sont étanches. Le point d'arrêt du passage paracellulaire de la WGA-HRP est localisé à l'aide d'une flèche (Figures 40A à 40E). Ces clichés témoins démontrent la présence de jonctions intercellulaires intactes en normoxie.

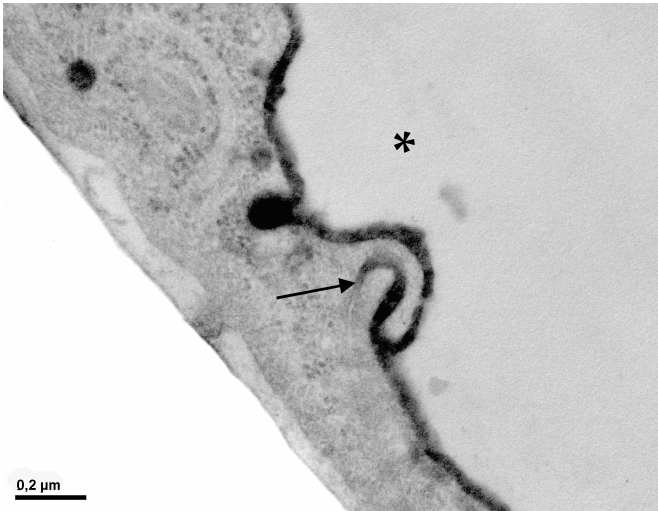
F. OGD



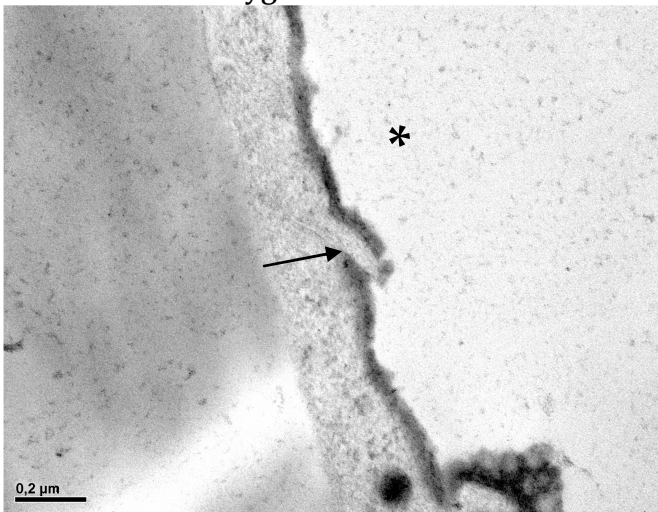
G. OGD



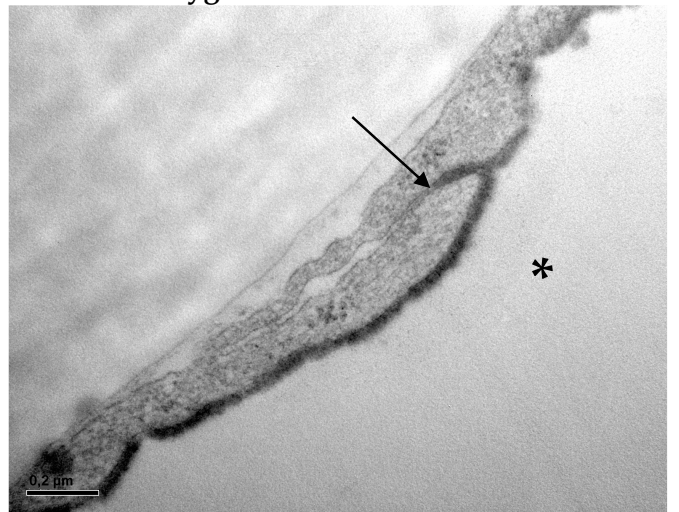
A. Normoxie



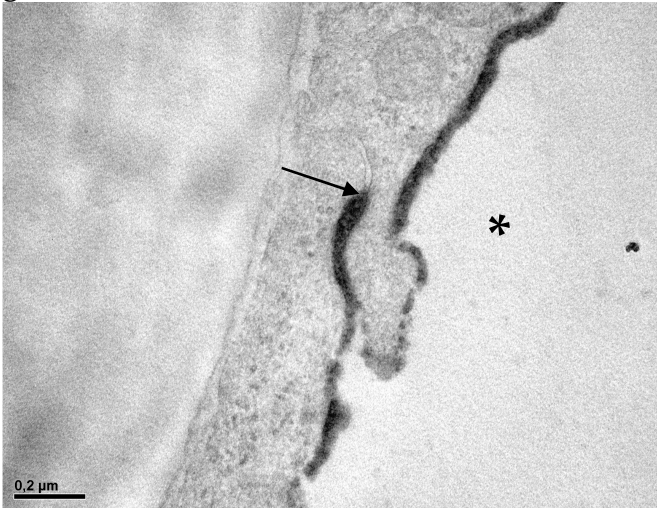
B. Normoxie/ réoxygénation 2h



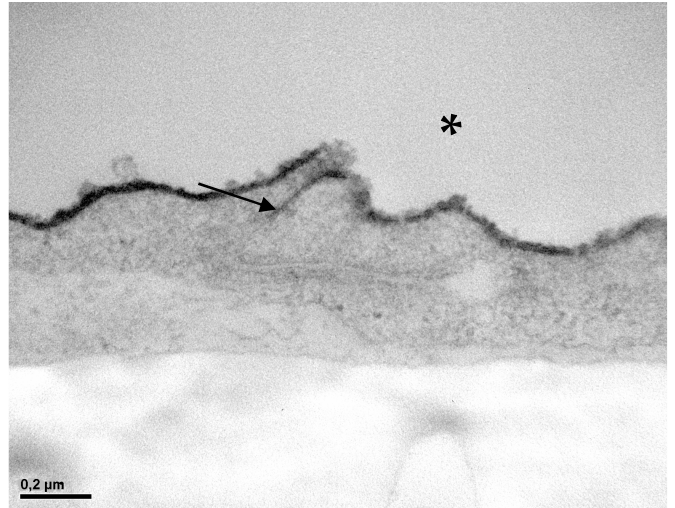
H. OGD/ réoxygénation 2h



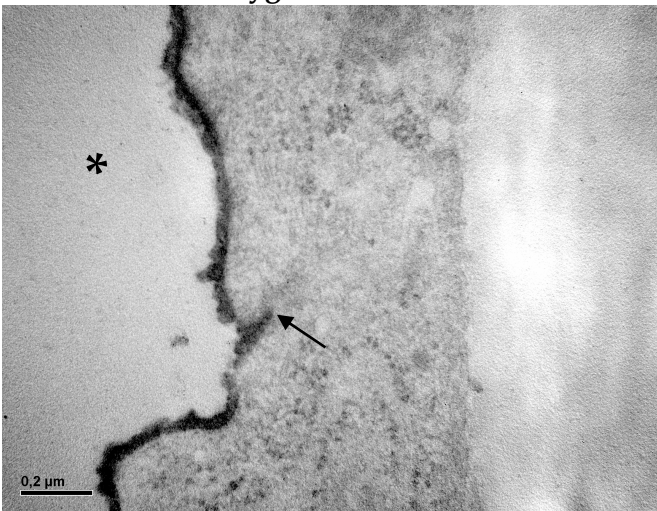
C. Normoxie / réoxygénation 2h avec cellules gliales non ischémisées



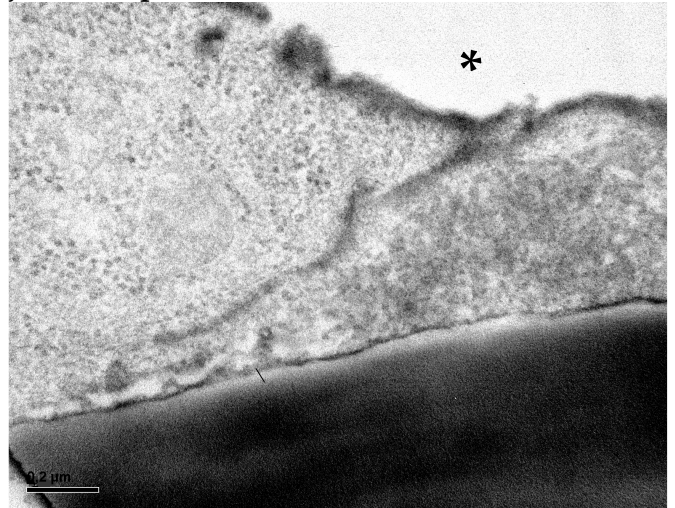
I. OGD /réoxygénation 2h avec cellules gliales non ischémisées



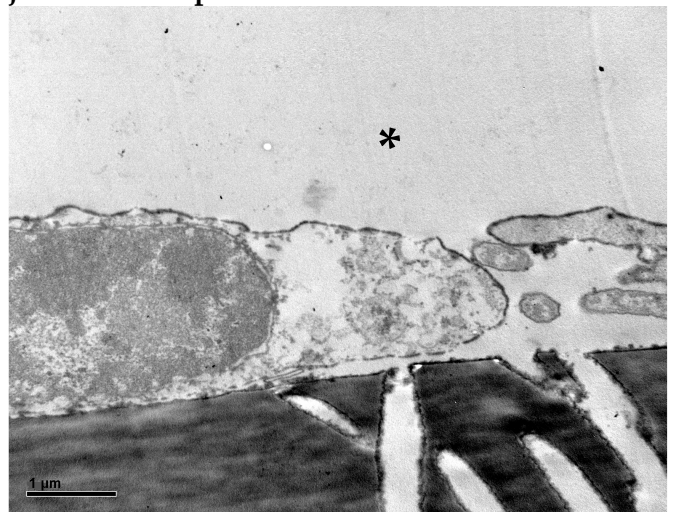
D. Normoxie/ réoxygénation 24h



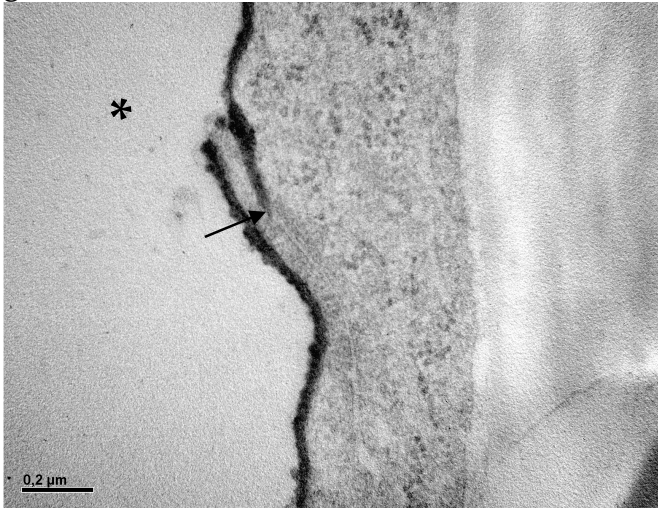
J. OGD /réoxygénation 24h : jonctions perméables



K. OGD /réoxygénation 24h : jonctions rompues



E. Normoxie réoxygénation 24h avec cellules gliales non ischémisées



L. OGD /réoxygénation 24h avec cellules gliales non ischémisées

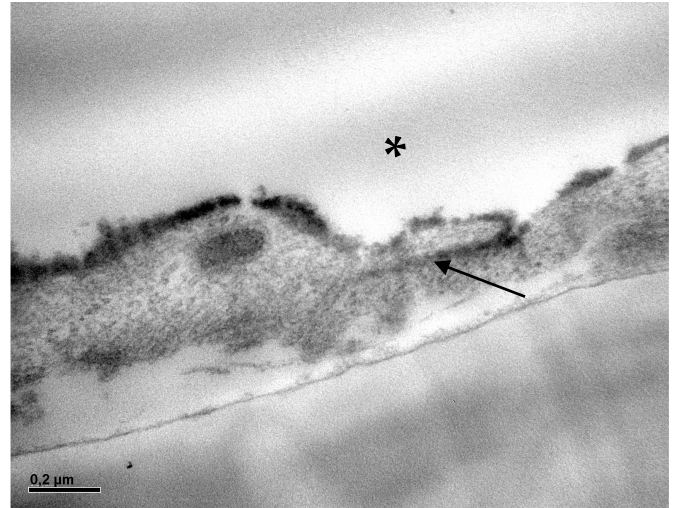


Figure 40 : Etude ultrastructurale du passage de la WGA-HRP au travers des jonctions serrées des cellules endothéliales de BHE. Les images correspondent à des photos de microscopie électronique des jonctions serrées des cellules endothéliales en condition physiologique de normoxie (A à E) ou en condition pathologique d'OGD (F à L) ayant subi ou non la réoxygénation. La localisation de la face luminale des cellules endothéliales est indiquée par un astérisque (*). Le point d'arrêt de la pénétration de la WGA-HRP au niveau des jonctions intercellulaires étanches est indiqué par une flèche. Lorsque les jonctions serrées intercellulaires ne sont plus étanches, le point d'arrivée de la pénétration de la WGA-HRP au niveau de la face abuminale est indiqué par une pointe de flèche. Barres= 0,2µm.

L'étude dans les conditions pathologiques d'OGD a permis de mettre en évidence une modulation de la perméabilité des jonctions serrées permettant la pénétration de la WGA-HRP au travers des jonctions serrées qui est alors capable d'atteindre le filtre sous jacent (figure 40F) ainsi que dans certaines zones des jonctions étanches (figure 40G). Ce résultat montre une perméabilisation hétérogène des jonctions serrées au sein de la monocouche de cellules endothéliales. En effet on observe deux états différents des jonctions serrées, des zones où les jonctions serrées sont encore perméables mais également des zones où les jonctions sont imperméables. Cette régulation fine apparaît en microscopie électronique alors qu'aucune rupture n'était visible en microscopie photonique (figure 39F).

Ainsi ces résultats proposent que l'augmentation de la perméabilité endothéliale induite par l'incubation en OGD dépende d'un mécanisme de régulation de la perméabilité des jonctions serrées. Cependant, dès 2h de réoxygénation, le passage paracellulaire de la WGA-HRP est arrêté au niveau de la jonction serrée (figure 40H) démontrant que les jonctions serrées sont redevenues étanches. Le même résultat est obtenu pour la condition 2h avec des cellules gliales non ischémisées (figure 40I). Ceci illustre l'existence d'une régulation fine de la perméabilité des jonctions serrées suite à l'OGD qui est en réalité une ouverture réversible puisque dès 2h de

réoxygénation les jonctions redeviennent imperméables quelque soit la viabilité des cellules gliales. Cette refermeture précoce semble alors dépendre de la capacité des cellules gliales à moduler les propriétés des cellules endothéliales de la BHE et de restaurer la structure des jonctions serrées.

Cependant, suite à 24h de réoxygénation, on observe le passage paracellulaire de la WGA-HRP au travers des jonctions serrées, jusqu'à la surface du filtre sous jacent ainsi que dans certaines zones une perte de contact physique entre les cellules endothéliales adjacentes (figure 40J et 40K). Cette rupture physique des jonctions serrées représente une rupture irréversible. Ces clichés précisent l'observation faite de la rupture déjà visible en microscopie photonique (figure 39I). Malgré la refermeture observée à 2h, des signaux déclenchent à nouveau des mécanismes qui aboutissent à une véritable rupture des jonctions serrées à 24h bien que cette rupture soit précédée d'une phase de perméabilité plus faible à 16h sans revenir à une perméabilité basale. A ce temps, la BHE est considérée comme perméable à cause d'un coefficient de perméabilité supérieur à 1.

Parallèlement, suite à 24h de réoxygénation avec les cellules gliales non ischémisées, les jonctions serrées sont toujours étanches. Ainsi pour un temps plus tardif de réoxygénation, les modifications de la perméabilité endothéliale sont associées à des modifications irréversibles des jonctions serrées. Les mécanismes semblent dépendre directement des cellules gliales, qui suite à 24h de réoxygénation provoquent une rupture irréversible des jonctions serrées ce qui pourrait correspondre aux conséquences de l'activation de cascades biologiques impliquées dans la rupture de la BHE.

Ainsi, ces résultats mettent en avant la gradation des évènements cellulaires impliqués dans la modulation de la perméabilité endothéliale lors de l'OGD/réoxygénation. En effet, l'augmentation de la perméabilité endothéliale induite par l'OGD implique un mécanisme réversible régulant la perméabilité des jonctions serrées. De plus, on observe une récupération fonctionnelle des jonctions serrées dès 2h de réoxygénation. Enfin suite à 24h de réoxygénation, on observe une rupture irréversible des jonctions serrées uniquement dans les conditions pathologiques alors que la présence de cellules gliales non ischémisées montre une récupération fonctionnelle qui semble définitive. Ce mécanisme tardif semble dépendre d'une influence gliale induite lors de la réoxygénation. Ces résultats montrent l'implication de mécanismes différents dans les temps précoces qui modulent l'étanchéité des jonctions serrées alors que dans les temps tardifs, les mécanismes impliqués induisent une rupture

définitive des jonctions serrées. Cela met en évidence un desserrage des jonctions serrées dans les temps précoces de l'ischémie. Si cette étape précoce est suivie d'une reperfusion, celle-ci semble restaurer la structure serrée des jonctions. Cependant, de nouveaux *stimuli* pourraient enclencher à nouveau une séparation de ces jonctions qui à 24h semble plus marquée comme observé dans la plupart des zones.

III.3.5 Mesure du coefficient apparent de diffusion de l'eau : Translation vers un modèle expérimental préclinique.

Lors de l'ischémie/reperfusion, les perturbations de l'homéostasie ionique et les mouvements d'eau associés apparaissent suite à la formation de l'œdème cytotoxique (on observe le gonflement des cellules par accumulation d'eau dans le compartiment intracellulaire) ou un œdème vasogénique (observé lors de la rupture de la BHE entraînant une accumulation d'eau dans le parenchyme cérébral). L'ensemble de ces mécanismes modifie la mobilité des molécules d'eau consécutivement à l'augmentation du volume cellulaire ou encore à la rupture des vaisseaux sanguins. De nouvelles mesures en imagerie apparaissent comme la mesure de la mobilité des molécules d'eau lors de l'ischémie cérébrale par quantification du coefficient apparent de diffusion de l'eau (ADC). Ceci nous renseigne sur les contraintes appliquées aux molécules d'eau dans le but de mieux comprendre l'évolution des lésions cérébrales. Afin d'étudier les modulations de la mobilité de l'eau lors de l'ischémie/reperfusion, nous avons ce coefficient.

Pour cela nous nous sommes tout d'abord intéressés au suivi de la mesure de l'ADC au cours des 60 minutes d'occlusion. Dans ces conditions, on observe une différence de la valeur initiale mesurée entre la région ipsilatérale (région lésée) et la région controlatérale (région non lésée). Initialement à une valeur de $680 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ qui correspond à une valeur associée à un tissu sain, durant le protocole expérimental, la valeur d'ADC chute à $410 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ et reste stable pendant les 60 minutes d'occlusion (figure 41). L'occlusion provoque donc une perturbation précoce du coefficient d'ADC. Cette diminution traduit une première phase de perturbation précoce dans la zone d'infarctus non détectable par les autres modalités d'imagerie IRM et prédit l'infarctus constitué plus tardivement.

Suivi du coefficient apparent de diffusion (ADC) pendant l'occlusion

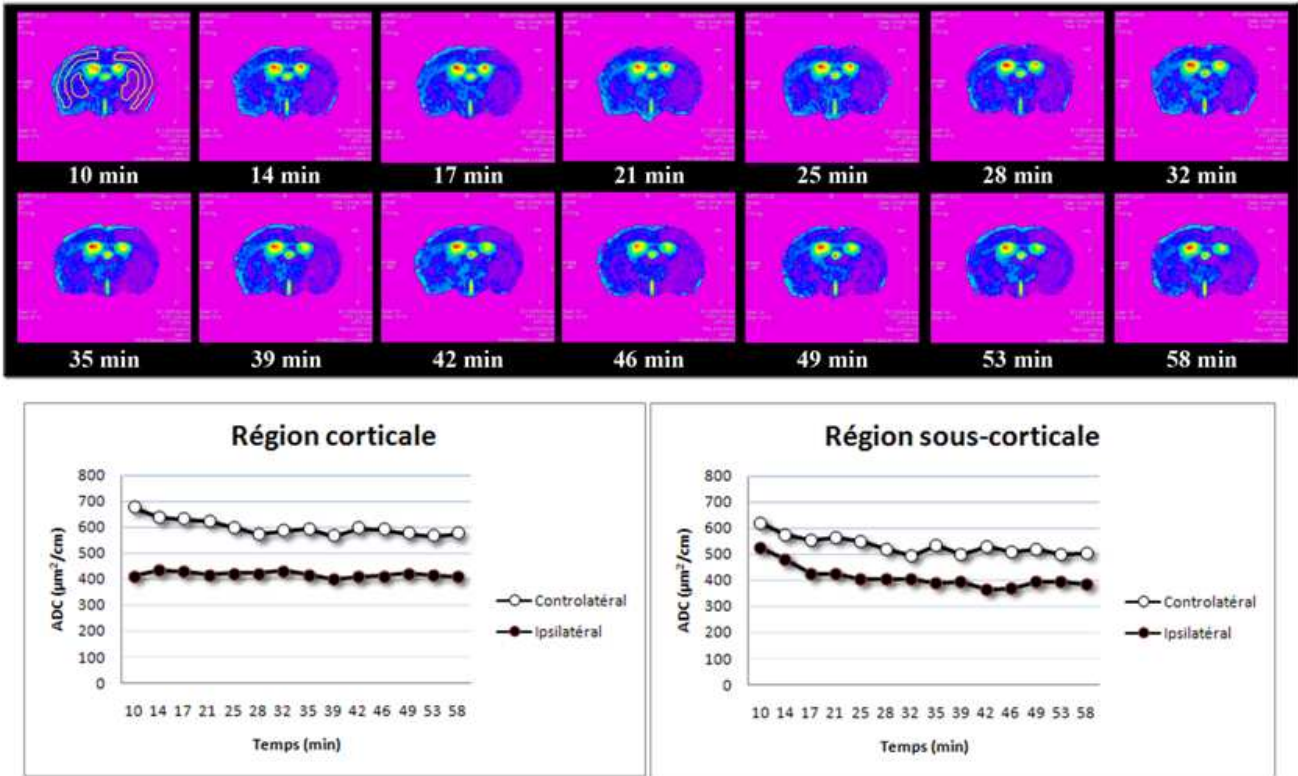


Figure 41 : Courbe de mesure du coefficient d'ADC lors des 60 minutes d'occlusion chez la souris.

L'étape suivante consiste naturellement à explorer les variations de l'ADC au cours de la reperfusion. La mesure du coefficient dans les premiers temps de la reperfusion allant de 2h, 4h et 8h a été réalisée pour une première souris après la MCAO ; un suivi à long terme, allant jusqu'à 72h à été réalisé sur une seconde souris. Le profil de la mesure est donné dans la figure 42.

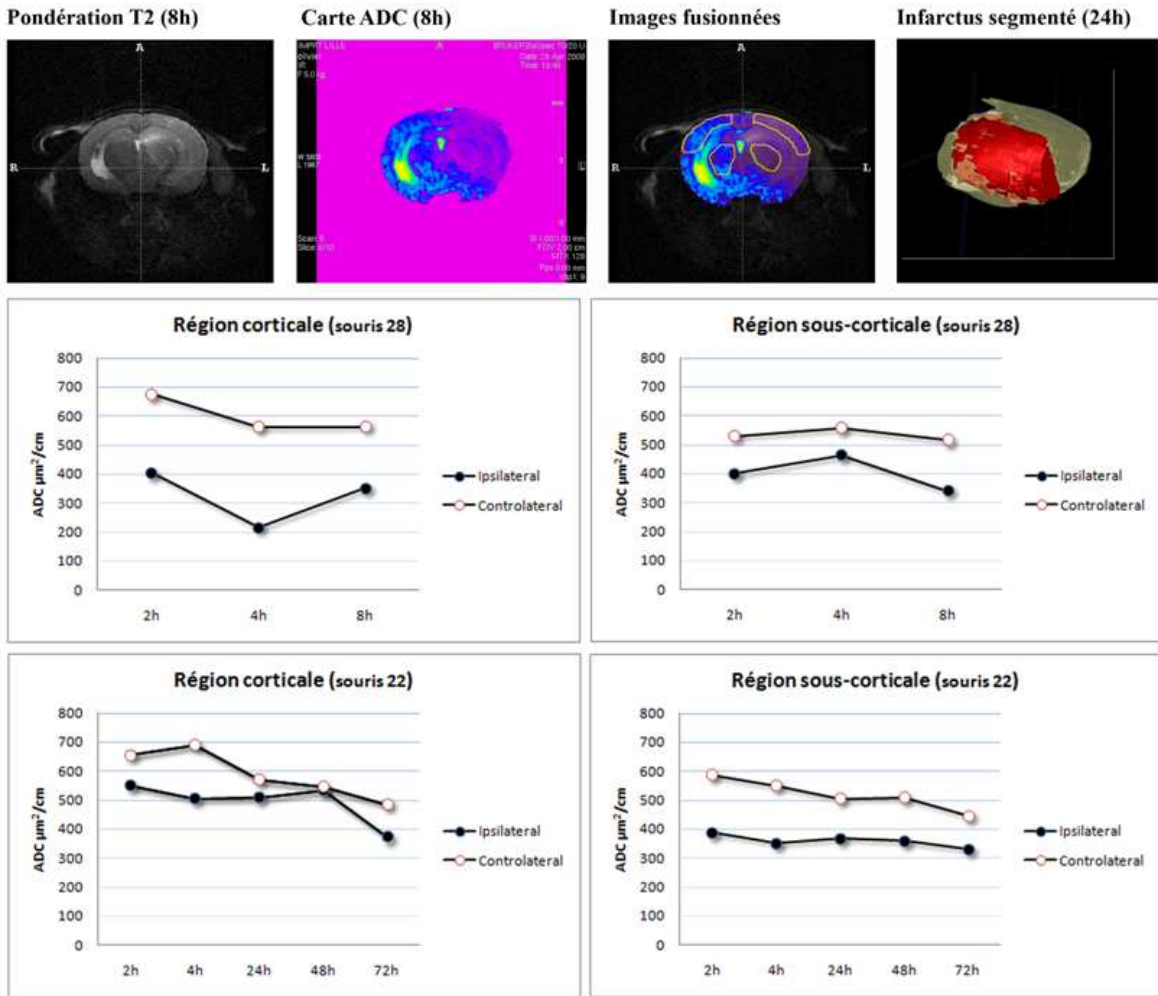


Figure 42 : Courbe de variation du coefficient apparent de diffusion de l'eau mesuré chez la souris suite à 60 minutes d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne dans les régions corticale et sous corticale.

La première observation faite à la vue des courbes de mesure de l'ADC, est que la reperfusion modifie la mobilité des molécules d'eau d'une façon non linéaire comparée à la phase d'occlusion. Pour le premier cas (souris 28), la mesure de l'ADC a été réalisée toutes les 2h jusqu'à 8h post ischémie. Le tracé de l'évolution de l'ADC montre une diminution rapide et abrupte dans la région corticale de la zone lésée dès 4h de reperfusion suivie d'une augmentation à 8h. On mesure également une diminution mais cette fois-ci plus tardive dans la région sous corticale à 8h de reperfusion.

Le second cas a été suivi (souris 22) sur des temps plus longs. On mesure une diminution pondérée dans les temps précoces (de 2h à 24h post reperfusion) suivie d'une augmentation progressive de l'ADC jusqu'à des valeurs normales à 48h reperfusion. Cette phase se propage dans le temps avec une nouvelle diminution de cette valeur à 72h. La variation de l'ADC dans

ce cas est plus modérée et n'est pas observée dans les régions plus profondes puisque qu'aucune variation n'est mesurée dans la région sous corticale.

Bien que ces résultats nécessitent d'être confirmés, ils permettent de suggérer qu'il existe des différences observables en IRM de diffusion dans les variations de l'ADC entre l'occlusion et la reperfusion.

Au regard de ces premiers résultats d'ischémie/reperfusion expérimentale, on peut rapprocher les variations d'ADC à la cinétique d'ouverture mesurée en OGD/réoxygénation sur les cellules endothéliales de BHE. Les modifications de l'homéostasie hydrique observées *in vivo*, pourraient être influencées par les sécrétions gliales. En effet, le glutamate semble, dans nos expériences *in vitro*, présenter des variations de concentration corrélées avec les augmentations de perméabilité. De plus, le transporteur du glutamate colocalisé avec l'AQP-4 astrocytaire pourrait alors modifier l'homéostasie hydrique et influencer la formation de l'œdème comme suggéré par plusieurs études *in vitro* utilisant des cultures d'astrocytes (Zeng et al. 2007; Gunnarson et al. 2008). Cependant le glutamate pourrait ne représenter qu'un acteur parmi l'ensemble des molécules sécrétées par les cellules gliales.

III.3 Conclusion

Les expériences menées lors de cette étude ont montré la complexité de la réponse des cellules endothéliales au stress de l'OGD/réoxygénation. En effet, le profil biphasique de la perméabilité endothéliale semble impliquer les cellules gliales et dépendre également de leur viabilité. Ainsi, le modèle de co-culture a mis en évidence que l'influence des cellules gliales sur la perméabilité endothéliale s'exerce également lors de la réoxygénation.

De plus, l'étude des mécanismes cellulaires de régulation de la perméabilité met en avant une régulation des jonctions serrées. L'étude de l'ultrastructure des jonctions serrées en microscopie électronique a permis de mettre en évidence une régulation fine des jonctions qui n'est pas visible microscopie photonique. Cependant, des mécanismes délétères spécifiques de la réoxygénation pourraient entraîner une aggravation des dommages vasculaires provoquant la rupture irréversible des jonctions serrées.

Cette étude met en avant l'existence d'une gradation dans la dysfonction de la BHE lors de la réoxygénation qui dépend des cellules gliales. De plus, ces résultats suggèrent qu'une préservation des cellules gliales aux effets délétères de l'OGD pourrait limiter la dysfonction vasculaire et préserver la BHE dans les temps tardifs. Bien que la reperfusion suggère un retour à des conditions normales (observé par une diminution de la perméabilité après l'OGD) la dysfonction de l'endothélium s'accroît sous l'influence des cellules gliales et leur réponse au stress.

Discussion générale

Lors de l'ischémie cérébrale, l'arrêt de la circulation provoque le déclenchement d'une cascade physiopathologique entraînant rapidement la mort neuronale. De plus, lors de la reperfusion, le stress oxydant et l'inflammation contribuent à l'extension des lésions (Doyle et al. 2008). Initialement, les recherches portant sur l'ischémie cérébrale se focalisaient sur les neurones considérés pendant longtemps comme les premières cibles de l'ischémie. Cependant, bien que de nombreux composés neuroprotecteurs soient développés pour limiter la lésion cérébrale, aucun n'a réussi à protéger efficacement les neurones de la mort lors de la phase aiguë de l'ischémie (Green 2008) (Ducruet et al. 2009). De plus, comme les neurones ne représentent que 5% des cellules cérébrales, par conséquent cette pathologie affecte non seulement les neurones mais également les microvaisseaux ainsi que les cellules gliales qui supportent leur fonction (del Zoppo 2006). L'échec de la neuroprotection reflèterait la méconnaissance des mécanismes impliqués dans l'évolution des dommages qui pourrait s'expliquer par l'existence d'interactions complexes entre les cellules nerveuses et la BHE au sein de l'unité fonctionnelle dite neuroglivovasculaire (UNGV) (Iadecola 2004). En effet, l'ischémie cérébrale est en réalité une pathologie vasculaire entraînant une mort neuronale. La progression de la lésion parenchymateuse est accompagnée d'une dysfonction vasculaire. Dans les conditions physiologiques, la BHE permet le maintien de l'homéostasie cérébrale. Dans les conditions pathologiques comme l'ischémie cérébrale, une augmentation de la perméabilité de la BHE entraîne la formation d'un oedème cérébral accélérant la mort neuronale et engageant par conséquent le pronostic vital des patients. L'étude de la réponse des microvaisseaux cérébraux aux conséquences de l'ischémie devient un sujet d'étude émergent. Cependant, bien qu'il existe de nombreux modèles *in vivo* d'études de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale, les mécanismes cellulaires et moléculaires de la dysfonction de la BHE demeurent inconnus et difficilement appréhendables par des approches *in vivo*. Ceci met en avant la nécessité de développer des modèles *in vitro*.

I. La BHE : une cible pharmacologique pertinente pour traiter l'ischémie cérébrale

Nous disposons au laboratoire d'un modèle bovin de BHE constitué de cellules endothéliales de capillaires cérébraux co-cultivées avec des cellules gliales (Dehouck et al. 1990; Cecchelli et al. 1999). Ce modèle est utilisé pour prédire le passage de composés au travers de l'endothélium (Culot et al. 2008; Hallier-Vanuxeem et al. 2009) mais il est également adapté à l'étude de la perméabilité endothéliale lors de la phase précoce de l'ischémie cérébrale *in vitro* appelé OGD (Brillault et al. 2002). Plus récemment, le développement d'un modèle syngénique murin pour l'étude de mécanismes inflammatoires (Coisne et al. 2005; Coisne et al. 2006) présente l'avantage d'une accessibilité aux outils moléculaires disponibles chez la souris notamment l'utilisation de cellules issues d'animaux génétiquement modifiées. L'utilisation de ce modèle pour l'étude de l'ischémie cérébrale a nécessité de nombreuses mises au point. En effet, la nature primaire du modèle murin a nécessité l'adaptation à la fois du milieu de culture mais également de définir les conditions expérimentales. Nous avons défini les conditions d'incubation en adaptant la composition du milieu d'OGD ainsi que son taux en oxygène mais également en adaptant les temps d'incubation. Les conditions expérimentales établies, le modèle a permis une approche pharmacologique dans l'identification des mécanismes d'action cellulaires et moléculaires du fénofibrate sur la BHE lors de l'ischémie cérébrale.

Le fénofibrate est un agent pharmacologique de la famille des fibrates prescrit pour ces propriétés normolipémiantes. Ce composé a récemment montré un effet protecteur préventif *in vivo* chez la souris soumis à une ischémie cérébrale (Deplanque et al. 2003). Par ailleurs, dans cette étude réalisée en 2003, l'utilisation de notre modèle bovin indiquait que la BHE était peu perméable à l'acide fénofibrique dans les conditions physiologiques. Par conséquent, il a été proposé que les effets mesurés *in vivo* pourraient être dûs à une action vasculaire (Deplanque et al. 2003). Nos travaux présentés ici montrent que le fénofibrate est capable de protéger la BHE en limitant l'hyperperméabilité induite par les conditions d'OGD. L'identification de l'endothélium de la BHE comme cible cellulaire de l'action protectrice a été possible grâce au système de co-culture qui permet la réalisation d'un traitement séparé des cellules gliales et des cellules endothéliales. Les composés de la famille des fibrates présentent de multiples effets identifiés suite à l'activation du récepteur nucléaire PPAR- α capable de réguler l'expression de nombreux gènes cibles. La validation de la cible moléculaire a été possible grâce à l'utilisation de cellules endothéliales issues de souris dont le gène codant pour PPAR- α a été inactivé, ce qui

a permis de valider le récepteur nucléaire comme cible moléculaire de l'action du fénofibrate (Deplanque et al. 2003).

Le mécanisme d'action du composé semble préventif, enclenché dès le début du traitement et maintenu pendant l'OGD, bien que le composé ne soit pas présent dans le milieu moment de l'incubation. On mesure également un effet rapide. Ceci a suggéré initialement une modulation préventive de l'expression des gènes. Cependant l'analyse en normoxie n'a pas montré de régulation ce qui suggère que le fénofibrate ne régulerait que des gènes induits pas l'OGD. La première approche a permis d'identifier trois gènes dont l'expression est augmentée en OGD et diminuée par le fénofibrate. Cependant, ces gènes présentent des conséquences plus tardives lors de l'inflammation post ischémique. La protection endothéliale est observée lors de l'OGD, c'est-à-dire dans des conditions expérimentales mimant les conséquences immédiates de l'occlusion. Ainsi cet effet transcriptionnel ne semble pas être le seul mécanisme responsable de l'effet protecteur mesuré, d'autres voies de signalisation sont nécessairement impliquées dans ce mécanisme. L'identification des voies de signalisation modulées par l'activation de PPAR- α permettrait la mise en évidence de nouvelles cibles pharmacologiques dans le traitement de l'ischémie cérébrale.

Cette approche pharmacologique a permis pour la première fois de faire la preuve d'une protection vasculaire agissant sur la perméabilité des cellules endothéliales de BHE lors de la phase précoce de l'ischémie cérébrale. La préservation précoce de l'intégrité de la BHE permettrait de prévenir la formation de l'œdème vasogénique souvent observé dans les étapes plus tardives, lors de la reperfusion. (Betz et al. 1989; Simard et al. 2007). De plus, l'utilisation de cellules PPAR- α KO représente une première étape dans l'identification des mécanismes moléculaires de cette protection microvasculaire déclenchée par l'activation de PPAR- α .

Cette étude réalisée à l'aide du modèle murin de co-culture, renforce les arguments en faveur de la prise en compte de la dysfonction vasculaire précoce dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Elle démontre aussi que cette stratégie expérimentale est adaptée à l'évaluation à l'échelle cellulaire de l'effet de molécules candidates potentiellement protectrices.

Le traitement par le fénofibrate représente une nouvelle stratégie thérapeutique préventive qui induirait une modulation simultanée des différentes voies impliquées dans la physiopathologie de l'ischémie. De plus, bien que nous ayons observé une action exclusivement endothéliale dans notre modèle, cette action pléiotrope pourrait cibler

également les cellules du parenchyme cérébral comme récemment montré (Ouk et al. 2009). Dans cette étude, l'action du ligand de PPAR- α semble enclencher des mécanismes de protection différents (préconditionnement ou action rapide dépendante du ligand)

Les molécules à action pléiotrope comme le fénofibrate démontrent par ailleurs l'intérêt d'une protection globale de l'unité neuroglivovasculaire qui est considérée comme essentielle pour assurer une protection cérébrale globale contre l'ischémie cérébrale. (Takahashi and Macdonald 2004).

Cependant, bien que les études expérimentales apportent des résultats encourageants, le récent échec du NXY-059 démontre la difficulté de transférer les résultats positifs obtenus lors des études précliniques à la clinique. L'effet protecteur du NXY-059 avait été démontré dans de nombreuses études expérimentales, mais l'absence d'amélioration clinique observée lors de la phase III de l'étude a entraîné l'arrêt du développement du composé. Ceci démontre la complexité de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et de l'action des composés pharmacologiques. Ainsi cela met en évidence la nécessité d'une amélioration des modèles pour l'étude de la physiopathologie humaine. Cette amélioration des modèles *in vitro* passe par une adaptation des conditions expérimentales à l'étude des phénomènes tardifs mais également dans la prise en compte des intercommunications cellulaires au sein de l'UNGV. L'ischémie cérébrale est avant tout une pathologie vasculaire présentant des conséquences neuronales et résultant de l'activation de l'ensemble des cellules de cette unité. Dans notre modèle, la prise en compte de l'ensemble de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale nécessite l'étude des dommages post occlusion c'est-à-dire ceux déclenchés lors de la reperfusion.

II. Etude des effets de la reperfusion sur le modèle *in vitro* de BHE

Dans le but d'étudier les conséquences de la réoxygénation sur la perméabilité de la BHE, nous avons mis au point les conditions d'OGD/réoxygénation sur notre modèle. Le suivi de la perméabilité de la BHE dans les 24 premières heures de réoxygénation a montré un profil de perméabilité biphasique. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études menées *in vivo* démontrant l'apparition d'une seconde ouverture de la BHE suite à la reperfusion bien que l'échelle de temps peut varier entre les différentes études (Kuroiwa et al. 1985; Belayev et al. 1996; Rosenberg et al. 1998; Huang et al. 1999). En revanche, des études récentes mettent en avant l'absence de récupération de la BHE suite à l'ischémie/reperfusion après la première

augmentation de perméabilité (Kastrup et al. 1999; Wu et al. 2001; Nagel et al. 2004; Veltkamp et al. 2005) indiquant ici que la BHE reste ouverte pendant les jours (Nagel et al. 2008) et les semaines suivant l'AVC (Lin et al. 2002; Durukan et al. 2008; Strbian et al. 2008). Ainsi, bien que la multitude de profils et de cinétiques d'augmentation de la perméabilité vasculaire mesurés dans ces études *in vivo* puissent refléter l'hétérogénéité des cas observés en clinique, ces études ne peuvent que transcrire la complexité des mécanismes mis en jeu. Ainsi l'utilisation d'un modèle *in vitro* de BHE permet une approche cellulaire et moléculaire dans l'identification des mécanismes impliqués.

Notre étude a pu mettre en évidence l'importance des cellules gliales dans la réponse de l'endothélium en terme de perméabilité au stress de la réoxygénation. Cette observation s'ajoute à celle déjà reconnue lors de l'OGD dans le modèle bovin et le modèle murin puisque l'augmentation de la perméabilité endothéliale n'est mesurée qu'en présence de cellules gliales (Brillault et al. 2002; Mysiorek et al. 2009; Culot et al. 2009).

Nous avons montré que la viabilité des cellules gliales pourrait être à l'origine de l'ouverture biphasique de la BHE lors de la reperfusion. Ceci montre que du degré d'atteinte des cellules gliales par l'ischémie dépend la perméabilité de l'endothélium de la BHE lors de la reperfusion. Des travaux restent à effectuer pour établir le seuil auquel les cellules gliales commencent à provoquer l'ouverture de la BHE en reperfusion. Nos expériences utilisant des lysats de cellules gliales ont permis de montrer que la mort de ces cellules n'est pas la cause de l'augmentation de perméabilité endothéliale. De plus, l'absence d'augmentation de la perméabilité endothéliale lors de l'utilisation de milieu conditionné de cellules gliales ischémiées met en avant la nécessité d'une sensibilisation des cellules endothéliales nécessaire pour répondre aux facteurs gliaux sécrétés. La communication entre les cellules gliales et les cellules endothéliales semble s'effectuer par la sécrétion de ces facteurs. Notre première approche par le dosage du glutamate montre qu'il représenterait un acteur potentiel de l'augmentation de perméabilité de la BHE comme suggéré dans deux études (Mayhan and Didion 1996; Liu et al. 2004). Cependant, d'autres expériences sont nécessaires afin de valider cette hypothèse. De plus, une approche plus globale d'identification des facteurs présents dans le milieu de sécrétions des cellules gliales permettrait de mieux comprendre la communication entre ces deux types cellulaires.

Au niveau endothélial, l'étude des jonctions serrées à l'aide de deux techniques complémentaires, la microscopie photonique à fluorescence et la microscopie électronique a permis d'observer le mécanisme cellulaire responsable des modifications de la perméabilité

endothéliale sur le modèle. Nous avons pu mettre en évidence une perméabilisation précoce des jonctions serrées intervenant suite à l'OGD. Cette dysfonction temporaire pourrait impliquer l'intervention d'un mécanisme de régulation des jonctions serrées lié à la phase d'occlusion. Cette première étape est réversible puisque dès 2h de réoxygénation les jonctions serrées redeviennent étanches et fonctionnelles. Cette première phase de récupération serait essentiellement liée à la capacité des cellules gliales à restaurer la fonctionnalité des jonctions serrées puisqu'en absence de cellules gliales, les cellules endothéliales présentent une augmentation transitoire de la perméabilité. L'augmentation tardive de la perméabilité est corrélée avec une rupture physique des jonctions serrées, déjà visible en microscopie photonique, qui traduit la gradation dans les mécanismes impliqués. Bien que l'augmentation de la perméabilité vasculaire soit fréquemment décrite comme impliquant la rupture physique des jonctions lors de l'hypoxie ou de l'ischémie réoxygénation les mécanismes sont rapportés dans des lignées cellulaires et les épithelia mais demeurent inconnus au niveau de la BHE (Mark and Davis 2002) (Sandoval and Witt 2008). Notre modèle cellulaire a permis de démontrer par des clichés de microscopie électronique la possibilité d'une régulation fine de l'organisation des jonctions serrées, qui n'est pas visible en microscopie photonique, ainsi qu'une évolution dans la dysfonction des jonctions serrées intercellulaires.

Tout comme l'hyperperméabilité endothéliale induite par l'OGD, l'ouverture de la BHE lors de la reperfusion semble également dépendre de la réponse des cellules gliales au stress ischémique. Cette seconde intercommunication engendre une évolution de la dysfonction endothéliale plus complexe encore qu'une ouverture linéaire en fonction du temps. La capacité de récupération de l'endothélium semble altérée par la réponse gliale, ce qui suggère qu'une préservation de l'intégrité de la BHE devrait pour être optimale cibler également les cellules gliales pour être efficace dans les étapes qui suivent la reperfusion. De nombreux efforts restent à fournir pour mieux caractériser les communications entre les cellules gliales et l'endothélium lors de la reperfusion, tout comme les mécanismes de régulation des jonctions serrées endothéliales qui sont déclenchés suite à ces *stimuli*.

L'ensemble de ces travaux met en avant le rôle central de la dysfonction de la BHE dans la pathologie de l'ischémie cérébrale. Ainsi la dysfonction retardée de la BHE est un élément à prendre en compte pour se rapprocher de la physiopathologie de l'ischémie *in vivo* et l'identifie comme une cible pertinente dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Une meilleure compréhension des mécanismes induisant la dysfonction de la BHE permettrait à terme une amélioration de l'approche thérapeutique de cette pathologie.

Perspectives de recherche

L'identification des acteurs moléculaires de la protection vasculaire induite par le fénofibrate :

Notre première approche de génomique utilisant la technique des puces à ADN, a mis en évidence l'absence de régulation préventive de gènes, dans les conditions témoins. Ces résultats nous ont permis d'émettre l'hypothèse d'une régulation de gènes déclenchés par l'OGD qui pourrait impliquer des interactions entre le PPAR- α et les facteurs de transcription. Comme nous avons observé une modulation de gènes cibles de PPAR- α uniquement lorsqu'ils sont déclenchés par l'OGD, une analyse plus globale est prévue de nouveau à l'aide des puces à ADN dans le but de trouver d'autres gènes cibles voir de nouveaux gènes modulés par le PPAR- α .

De plus, bien que le mécanisme de protection induit par le fénofibrate semble impliquer des mécanismes transcriptionnels. Une analyse protéomique est prévue grâce à la plateforme disponible au laboratoire, dans le but de vérifier les conséquences au niveau de la protéine. Cette analyse permettra de réaliser la carte protéique endothéliale caractéristique des différentes conditions d'étude. Nous pourrions identifier d'une part les protéines responsables de l'ouverture de la BHE en ischémie, et d'autre part les co-acteurs moléculaires de PPAR alpha, c'est-à-dire les protéines effectrices du mécanisme menant au phénomène de protection de la BHE dans ces conditions ischémiques.

Influence des cellules de l'unité neuroglivasculaire dans la dysfonction endothéliale lors de l'ischémie cérébrale

Identification des sécrétions gliales responsables de l'augmentation de la perméabilité de la BHE.

Le système de co-culture de cellules endothéliales et de cellules gliales permet de dissocier les partenaires cellulaires et de mettre en évidence l'intercommunication entre ces deux types cellulaires. Les travaux du laboratoire montrent que les cellules gliales participent à l'augmentation précoce de la perméabilité de la BHE au cours de l'ischémie par la sécrétion de facteurs solubles capables d'induire la perméabilisation de l'endothélium (Brillault et al. 2002; Mysiorek et al 2009; Culot et al. 2009). Une analyse du sécrétome de ces facteurs gliaux sécrétés lors de l'OGD et responsables de l'augmentation précoce de la perméabilité endothéliale,

représenterait une stratégie efficace pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de l'AVC.

Les modèles in vitro : vers la modélisation de l'unité neuroglivovasculaire.

Il apparaît évident aujourd'hui que l'étude de pathologie vasculaire ne peut se réduire à l'endothélium. Bien que le rôle des astrocytes soit aujourd'hui relativement bien documenté, la position stratégique des péricytes au sein de l'UNGV suggère fortement leur implication dans les pathologies vasculaires, influençant l'endothélium. Ainsi l'évolution des modèles *in vitro* nécessite l'étude de l'influence des autres types cellulaires de l'UNGV sur les propriétés de la BHE dans les conditions physiologiques mais également dans les conditions pathologiques telles que l'ischémie cérébrale. Pour cela, la réalisation d'une co-culture de cellules endothéliales avec des péricytes mais également d'un modèle de tri-culture contenant les péricytes, les cellules gliales ainsi que les cellules endothéliales permettrait d'identifier le rôle des péricytes dans la pathologie de l'ischémie cérébrale. Cet axe de recherche est dédié à une équipe du laboratoire chargée du développement de ces nouveaux modèles.

Effet de l'infiltration leucocytaire sur la perméabilité de la BHE lors de la réoxygénation.

Le modèle murin a été initialement développé pour l'étude des phénomènes inflammatoires (Coisne et al. 2005; Coisne et al. 2006). L'inflammation est une complication de l'ischémie cérébrale qui survient lors d'une étape tardive de l'ischémie/reperfusion (Amantea et al. 2009). Elle fait intervenir des cellules inflammatoires tels que les polynucléaires neutrophiles. Nos premiers travaux sur les effets de la reperfusion pourraient alors servir de base à l'étude du rôle de l'infiltration leucocytaire dans l'aggravation de l'ouverture de la BHE après la reperfusion. De plus cette approche *in vitro* permettrait d'apporter de nouveaux éléments pour la compréhension des événements lors de cette phase tardive, puisque aujourd'hui la question se pose encore sur la nature des leucocytes impliqués et les médiateurs moléculaires de la dégradation endothéliale (Rosell et al. 2008) (Coisne et al. 2007).

Les modèles *in vitro* développés au laboratoire représentent des outils précieux pour l'étude des phénomènes cellulaires et moléculaires impliqués dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. Ainsi afin de mieux appréhender le rôle des différentes cellules de l'unité neuro-glio-vasculaire dans la physiopathologie de l'ischémie mais également dans d'autres pathologies neurodégénératives, les modèles *in vitro* représentent les outils adaptés les plus modulables. L'amélioration de la connaissance des interactions entre ces différents types cellulaires au cours de l'ischémie fait partie des axes prioritaires de l'initiative européenne EUSTROKE (ou European Stroke Research Network) réunissant 18 partenaires industriels et académiques de l'union européenne.

Références Bibliographiques

- Abbott N. J. (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* **200**, 629-638.
- Abbott N. J., Revest P. A. and Romero I. A. (1992) Astrocyte-endothelial interaction: physiology and pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* **18**, 424-433.
- Abbott N. J., Ronnback L. and Hansson E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**, 41-53.
- Abbott N. J., Patabendige A. A., Dolman D. E., Yusof S. R. and Begley D. J. (2009) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*.
- Abbruscato T. J. and Davis T. P. (1999) Combination of hypoxia/aglycemia compromises in vitro blood-brain barrier integrity. *J Pharmacol Exp Ther* **289**, 668-675.
- Abbruscato T. J., Lopez S. P., Mark K. S., Hawkins B. T. and Davis T. P. (2002) Nicotine and cotinine modulate cerebral microvascular permeability and protein expression of ZO-1 through nicotinic acetylcholine receptors expressed on brain endothelial cells. *J Pharm Sci* **91**, 2525-2538.
- Allt G. and Lawrenson J. G. (2001) Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* **169**, 1-11.
- 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. (2001) Hypercholesterolemia, lipid-lowering agents, and the risk for brain infarction. *Neurology* **57**, S35-44.
- Amarenco P., Benavente O., Goldstein L. B., Callahan A., 3rd, Sillesen H., Hennerici M. G., Gilbert S., Rudolph A. E., Simunovic L., Zivin J. A. and Welch K. M. (2009) Results of the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) trial by stroke subtypes. *Stroke* **40**, 1405-1409.
- An P. and Xue Y. X. (2009) Effects of preconditioning on tight junction and cell adhesion of cerebral endothelial cells. *Brain Res* **1272**, 81-88.
- Anderson R. G., Brown M. S. and Goldstein J. L. (1977) Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* **10**, 351-364.
- Andjelkovic A. V., Stamatovic S. M. and Keep R. F. (2003) The protective effects of preconditioning on cerebral endothelial cells in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 1348-1355.
- Andras I. E., Deli M. A., Veszelka S., Hayashi K., Hennig B. and Toborek M. (2007) The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 1431-1443.
- Arsenijevic D., de Bilbao F., Plamondon J., Paradis E., Vallet P., Richard D., Langhans W. and Giannakopoulos P. (2006) Increased infarct size and lack of hyperphagic response after focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor beta-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**, 433-445.
- Asahi M., Huang Z., Thomas S., Yoshimura S., Sumii T., Mori T., Qiu J., Amin-Hanjani S., Huang P. L., Liao J. K., Lo E. H. and Moskowitz M. A. (2005) Protective effects of statins involving both eNOS and tPA in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 722-729.
- Ayata C. and Ropper A. H. (2002) Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci* **9**, 113-124.
- Backstrom J. R., Lim G. P., Cullen M. J. and Tokes Z. A. (1996) Matrix metalloproteinase-9

- (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci* **16**, 7910-7919.
- Badaut J., Lasbennes F., Magistretti P. J. and Regli L. (2002) Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 367-378.
- Balakumar P., Rose M., Ganti S. S., Krishan P. and Singh M. (2007) PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box? *Pharmacol Res* **56**, 91-98.
- Ballabh P., Braun A. and Nedergaard M. (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* **16**, 1-13.
- Bandopadhyay R., Orte C., Lawrenson J. G., Reid A. R., De Silva S. and Allt G. (2001) Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J Neurocytol* **30**, 35-44.
- Barone F. C. and Feuerstein G. Z. (1999) Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**, 819-834.
- Bastide M., Ouk T., Plaisier F., Petrault O., Stolc S. and Bordet R. (2007) Neurogliovascular unit after cerebral ischemia: is the vascular wall a pharmacological target. *Psychoneuroendocrinology* **32 Suppl 1**, S36-39.
- Bazzoni G. and Dejana E. (2004) Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* **84**, 869-901.
- Bazzoni G., Martinez-Estrada O. M., Orsenigo F., Cordenonsi M., Citi S. and Dejana E. (2000) Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* **275**, 20520-20526.
- Beck H. and Plate K. H. (2009) Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* **117**, 481-496.
- Beck H., Acker T., Wiessner C., Allegrini P. R. and Plate K. H. (2000) Expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and tie receptors after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* **157**, 1473-1483.
- Begley D. J. and Brightman M. W. (2003) Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res* **61**, 39-78.
- Belayev L., Busto R., Zhao W. and Ginsberg M. D. (1996) Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* **739**, 88-96.
- Benchenane K., Berezowski V., Ali C., Fernandez-Monreal M., Lopez-Atalaya J. P., Brillault J., Chuquet J., Nouvelot A., MacKenzie E. T., Bu G., Cecchelli R., Touzani O. and Vivien D. (2005) Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* **111**, 2241-2249.
- Bendayan R., Lee G. and Bendayan M. (2002) Functional expression and localization of P-glycoprotein at the blood brain barrier. *Microsc Res Tech* **57**, 365-380.
- Benjamin L. E., Hemo I. and Keshet E. (1998) A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **125**, 1591-1598.
- Berezowski V., Landry C., Dehouck M. P., Cecchelli R. and Fenart L. (2004a) Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res* **1018**, 1-9.
- Berezowski V., Miecz D., Marszalek M., Broer A., Broer S., Cecchelli R. and Nalecz K. A. (2004b) Involvement of OCTN2 and B0,+ in the transport of carnitine through an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Neurochem* **91**, 860-872.
- Berger C., Xia F., Maurer M. H. and Schwab S. (2008) Neuroprotection by pravastatin in acute

- ischemic stroke in rats. *Brain Res Rev* **58**, 48-56.
- Bernardo A. and Minghetti L. (2006) PPAR-gamma agonists as regulators of microglial activation and brain inflammation. *Curr Pharm Des* **12**, 93-109.
- Betz A. L. (1985) Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries. *J Neurochem* **44**, 574-579.
- Betz A. L., Iannotti F. and Hoff J. T. (1989) Brain edema: a classification based on blood-brain barrier integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **1**, 133-154.
- Black K. L., Baba T. and Pardridge W. M. (1994) Enzymatic barrier protects brain capillaries from leukotriene C4. *J Neurosurg* **81**, 745-751.
- Blanco V. M., Stern J. E. and Filosa J. A. (2008) Tone-dependent vascular responses to astrocyte-derived signals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H2855-2863.
- Bloomfield Rubins H., Davenport J., Babikian V., Brass L. M., Collins D., Wexler L., Wagner S., Papademetriou V., Rutan G. and Robins S. J. (2001) Reduction in stroke with gemfibrozil in men with coronary heart disease and low HDL cholesterol: The Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Circulation* **103**, 2828-2833.
- Bonini P., Cicconi S., Cardinale A., Vitale C., Serafino A. L., Ciotti M. T. and Marlier L. N. (2004) Oxidative stress induces p53-mediated apoptosis in glia: p53 transcription-independent way to die. *J Neurosci Res* **75**, 83-95.
- Booher J. and Sensenbrenner M. (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* **2**, 97-105.
- Bordet R. (2002) [Preventive neuroprotection: from experimental data to therapeutic strategies]. *Therapie* **57**, 540-547.
- Bradbury M. W. and Stulcova B. (1970) Efflux mechanism contributing to the stability of the potassium concentration in cerebrospinal fluid. *J Physiol* **208**, 415-430.
- Brillault J., Berezowski V., Cecchelli R. and Dehouck M. P. (2002) Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J Neurochem* **83**, 807-817.
- Brillault J., Lam T. I., Rutkowsky J. M., Foroutan S. and O'Donnell M. E. (2008) Hypoxia effects on cell volume and ion uptake of cerebral microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C88-96.
- Brinker G., Franke C., Hoehn M., Uhlenkuken U. and Hossmann K. A. (1999) Thrombolysis of cerebral clot embolism in rat: effect of treatment delay. *Neuroreport* **10**, 3269-3272.
- Bronger H., Konig J., Kopplow K., Steiner H. H., Ahmadi R., Herold-Mende C., Keppler D. and Nies A. T. (2005) ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Res* **65**, 11419-11428.
- Brown R. C. and Davis T. P. (2002) Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke* **33**, 1706-1711.
- Brown R. C. and Davis T. P. (2005) Hypoxia/aglycemia alters expression of occludin and actin in brain endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **327**, 1114-1123.
- Brown R. C., Mark K. S., Egleton R. D., Huber J. D., Burroughs A. R. and Davis T. P. (2003) Protection against hypoxia-induced increase in blood-brain barrier permeability: role of tight junction proteins and NFkappaB. *J Cell Sci* **116**, 693-700.
- Butt A. M. and Kalsi A. (2006) Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med* **10**, 33-44.
- Buttini M., Sauter A. and Boddeke H. W. (1994) Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* **23**, 126-134.
- Buxton R. B. and Frank L. R. (1997) A model for the coupling between cerebral blood flow and oxygen metabolism during neural stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**, 64-72.

- Cadet J. L. and Krasnova I. N. (2009) Cellular and molecular neurobiology of brain preconditioning. *Mol Neurobiol* **39**, 50-61.
- Candela P., Gosselet F., Miller F., Buee-Scherrer V., Torpier G., Cecchelli R. and Fenart L. (2008) Physiological pathway for low-density lipoproteins across the blood-brain barrier: transcytosis through brain capillary endothelial cells in vitro. *Endothelium* **15**, 254-264.
- Candelario-Jalil E., Yang Y. and Rosenberg G. A. (2009) Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* **158**, 983-994.
- Cecchelli R., Dehouck B., Descamps L., Fenart L., Buee-Scherrer V. V., Duhem C., Lundquist S., Rentfel M., Torpier G. and Dehouck M. P. (1999) In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* **36**, 165-178.
- Chan P. H. (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 2-14.
- Chan P. H., Schmidley J. W., Fishman R. A. and Longar S. M. (1984) Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology* **34**, 315-320.
- Chung H. K., Lee I. K., Kang H., Suh J. M., Kim H., Park K. C., Kim D. W., Kim Y. K., Ro H. K. and Shong M. (2002) Statin inhibits interferon-gamma-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Exp Mol Med* **34**, 451-461.
- Cisternino S., Mercier C., Bourasset F., Roux F. and Scherrmann J. M. (2004) Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res* **64**, 3296-3301.
- Coisne C., Lyck R. and Engelhardt B. (2007) Therapeutic targeting of leukocyte trafficking across the blood-brain barrier. *Inflamm Allergy Drug Targets* **6**, 210-222.
- Coisne C., Faveeuw C., Delplace Y., Dehouck L., Miller F., Cecchelli R. and Dehouck B. (2006) Differential expression of selectins by mouse brain capillary endothelial cells in vitro in response to distinct inflammatory stimuli. *Neurosci Lett* **392**, 216-220.
- Coisne C., Dehouck L., Faveeuw C., Delplace Y., Miller F., Landry C., Morissette C., Fenart L., Cecchelli R., Tremblay P. and Dehouck B. (2005) Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest* **85**, 734-746.
- 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-alpha agonist WY14643. *Free Radic Biol Med* **41**, 579-589.
- Cordenonsi M., D'Atri F., Hammar E., Parry D. A., Kendrick-Jones J., Shore D. and Citi S. (1999) Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol* **147**, 1569-1582.
- Cordon-Cardo C., O'Brien J. P., Casals D., Rittman-Grauer L., Biedler J. L., Melamed M. R. and Bertino J. R. (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 695-698.
- Crack P. J. and Taylor J. M. (2005) Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med* **38**, 1433-1444.
- Culot M., Lundquist S., Vanuxeem D., Nion S., Landry C., Delplace Y., Dehouck M. P., Berezowski V., Fenart L. and Cecchelli R. (2008) An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol In Vitro* **22**, 799-811.
- Culot M., Mysiorek C., Rentfel M., Roussel B. D., Hommet Y., Vivien D., Cecchelli R., Fenart L.,

- Berezowski V., Dehouck M. P. and Lundquist S. (2009) Cerebrovascular protection as a possible mechanism for the protective effects of NXY-059 in preclinical models: an in vitro study. *Brain Res.*
- Czeredys M., Mysiorek C., Kulikova N., Samluk L., Berezowski V., Cecchelli R. and Nalecz K. A. (2008) A polarized localization of amino acid/carnitine transporter B(0,+)⁺ (ATB(0,+)) in the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* **376**, 267-270.
- 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.
- Davignon J. (2004) Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* **109**, III39-43.
- Davis S., Aldrich T. H., Jones P. F., Acheson A., Compton D. L., Jain V., Ryan T. E., Bruno J., Radziejewski C., Maisonpierre P. C. and Yancopoulos G. D. (1996) Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**, 1161-1169.
- Deeley R. G., Westlake C. and Cole S. P. (2006) Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* **86**, 849-899.
- Dehouck B., Dehouck M. P., Fruchart J. C. and Cecchelli R. (1994) Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol* **126**, 465-473.
- Dehouck B., Fenart L., Dehouck M. P., Pierce A., Torpier G. and Cecchelli R. (1997) A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol* **138**, 877-889.
- Dehouck M. P., Meresse S., Delorme P., Fruchart J. C. and Cecchelli R. (1990) An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* **54**, 1798-1801.
- Dehouck M. P., Jolliet-Riant P., Bree F., Fruchart J. C., Cecchelli R. and Tillement J. P. (1992) Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. *J Neurochem* **58**, 1790-1797.
- Dejana E. (2004) Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 261-270.
- Dejana E., Corada M. and Lampugnani M. G. (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J* **9**, 910-918.
- del Zoppo G., Ginis I., Hallenbeck J. M., Iadecola C., Wang X. and Feuerstein G. Z. (2000) Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol* **10**, 95-112.
- del Zoppo G. J. (1997) Microvascular responses to cerebral ischemia/inflammation. *Ann N Y Acad Sci* **823**, 132-147.
- del Zoppo G. J. (2006) Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med* **354**, 553-555.
- del Zoppo G. J. and Hallenbeck J. M. (2000) Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res* **98**, 73-81.
- del Zoppo G. J. and Milner R. (2006) Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1966-1975.
- Del Zoppo G. J., Milner R., Mabuchi T., Hung S., Wang X. and Koziol J. A. (2006) Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. *Biochem Soc Trans* **34**, 1261-1266.
- del Zoppo G. J., Poock K., Pessin M. S., Wolpert S. M., Furlan A. J., Ferbert A., Alberts M. J., Zivin J. A., Wechsler L., Busse O. and et al. (1992) Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. *Ann Neurol* **32**, 78-86.

- Delerive P., De Bosscher K., Besnard S., Vanden Berghe W., Peters J. M., Gonzalez F. J., Fruchart J. C., Tedgui A., Haegeman G. and Staels B. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* **274**, 32048-32054.
- Delorme P., Grignon G. and Gayet J. (1968) [Ultrastructure of the capillaries in the telencephalon of the chicken during embryogenesis and postnatal growth]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **87**, 592-602.
- 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**, 1403-1410.
- Deplanque D., Gele P., Petrault O., Six I., Furman C., Bouly M., Nion S., Dupuis B., Leys D., Fruchart J. C., Cecchelli R., Staels B., Duriez P. and Bordet R. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. *J Neurosci* **23**, 6264-6271.
- Descamps L., Dehouck M. P., Torpier G. and Cecchelli R. (1996) Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am J Physiol* **270**, H1149-1158.
- Desvergne B. and Wahli W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* **20**, 649-688.
- Didier N., Romero I. A., Creminon C., Wijkhuisen A., Grassi J. and Mabondzo A. (2003) Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem* **86**, 246-254.
- Dimitrijevic O. B., Stamatovic S. M., Keep R. F. and Andjelkovic A. V. (2006) Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**, 797-810.
- Ding G., Jiang Q., Li L., Zhang L., Zhang Z. G., Panda S., Ewing J. R. and Chopp M. (2006) MRI of combination treatment of embolic stroke in rat with rtPA and atorvastatin. *J Neurol Sci* **246**, 139-147.
- Diradourian C., Girard J. and Pegorier J. P. (2005) Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie* **87**, 33-38.
- Dirnagl U., Iadecola C. and Moskowitz M. A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391-397.
- Donnan G. A., Fisher M., Macleod M. and Davis S. M. (2008) Stroke. *Lancet* **371**, 1612-1623.
- Doyle K. P., Simon R. P. and Stenzel-Poore M. P. (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* **55**, 310-318.
- Ducruet A. F., Grobelny B. T., Zacharia B. E., Hickman Z. L., Yeh M. L. and Connolly E. S. (2009) Pharmacotherapy of cerebral ischemia. *Expert Opin Pharmacother*.
- 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.
- Durukan A., Strbian D. and Tatlisumak T. (2008) Rodent models of ischemic stroke: a useful tool for stroke drug development. *Curr Pharm Des* **14**, 359-370.
- Durukan A., Marinkovic I., Strbian D., Pitkonen M., Pedrono E., Soenne L., Abo-Ramadan U. and Tatlisumak T. (2009) Post-ischemic blood-brain barrier leakage in rats: one-week follow-up by MRI. *Brain Res* **1280**, 158-165.
- Eisenblatter T. and Galla H. J. (2002) A new multidrug resistance protein at the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 1273-1278.
- Endres M. (2005) Statins and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 1093-1110.

- Endres M. and Laufs U. (2004) Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke* **35**, 2708-2711.
- Endres M., Laufs U., Liao J. K. and Moskowitz M. A. (2004) Targeting eNOS for stroke protection. *Trends Neurosci* **27**, 283-289.
- 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 U S A* **95**, 8880-8885.
- Erlich P. (1885) Das sauerstoffbedürfnis des organismus. Ein farbenanalytische studie. A Hirschwald Edit Berlin.
- 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.
- Farkas E. and Luiten P. G. (2001) Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **64**, 575-611.
- Fenart L., Buee-Scherrer V., Descamps L., Duhem C., Poullain M. G., Cecchelli R. and Dehouck M. P. (1998) Inhibition of P-glycoprotein: rapid assessment of its implication in blood-brain barrier integrity and drug transport to the brain by an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharm Res* **15**, 993-1000.
- Fenstermacher J., Gross P., Sposito N., Acuff V., Pettersen S. and Gruber K. (1988) Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann N Y Acad Sci* **529**, 21-30.
- Feuerstein G. Z., Liu T. and Barone F. C. (1994) Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **6**, 341-360.
- Fillebeen C., Descamps L., Dehouck M. P., Fenart L., Benaissa M., Spik G., Cecchelli R. and Pierce A. (1999) Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J Biol Chem* **274**, 7011-7017.
- Filosa J. A., Bonev A. D. and Nelson M. T. (2004) Calcium dynamics in cortical astrocytes and arterioles during neurovascular coupling. *Circ Res* **95**, e73-81.
- Fischer S., Wobben M., Kleinstuck J., Renz D. and Schaper W. (2000) Effect of astroglial cells on hypoxia-induced permeability in PBMEC cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C935-944.
- Fischer S., Wobben M., Marti H. H., Renz D. and Schaper W. (2002) Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. *Microvasc Res* **63**, 70-80.
- Fisher M. (2009) Pericyte signaling in the neurovascular unit. *Stroke* **40**, S13-15.
- Flamant L., Toffoli S., Raes M. and Michiels C. (2009) Hypoxia regulates inflammatory gene expression in endothelial cells. *Exp Cell Res* **315**, 733-747.
- Frank R. N., Dutta S. and Mancini M. A. (1987) Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **28**, 1086-1091.
- Frey A., Meckelein B., Weiler-Guttler H., Mockel B., Flach R. and Gassen H. G. (1991) Pericytes of the brain microvasculature express gamma-glutamyl transpeptidase. *Eur J Biochem* **202**, 421-429.
- Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K. and Tsukita S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* **141**, 1539-1550.
- Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S. and Tsukita S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **123**, 1777-1788.
- Gao B., Stieger B., Noe B., Fritschy J. M. and Meier P. J. (1999) Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. *J Histochem Cytochem* **47**, 1255-1264.

- Gao B., Hagenbuch B., Kullak-Ublick G. A., Benke D., Aguzzi A. and Meier P. J. (2000) Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **294**, 73-79.
- Garcia J. H., Liu K. F., Yoshida Y., Chen S. and Lian J. (1994) Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat). *Am J Pathol* **145**, 728-740.
- Gasche Y. and Copin J. C. (2003) [Blood-brain barrier pathophysiology and ischaemic brain oedema]. *Ann Fr Anesth Reanim* **22**, 312-319.
- Gasche Y., Soccal P. M., Kanemitsu M. and Copin J. C. (2006) Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front Biosci* **11**, 1289-1301.
- Gautier S., Petrault O., Gele P., Laprais M., Bastide M., Bauters A., Deplanque D., Jude B., Caron J. and Bordet R. (2003) Involvement of thrombolysis in recombinant tissue plasminogen activator-induced cerebral hemorrhages and effect on infarct volume and postischemic endothelial function. *Stroke* **34**, 2975-2979.
- Ge S., Song L. and Pachter J. S. (2005) Where is the blood-brain barrier. really? *J Neurosci Res* **79**, 421-427.
- Gentil B. J., Benaud C., Delphin C., Remy C., Berezowski V., Cecchelli R., Feraud O., Vittet D. and Baudier J. (2005) Specific AHNAK expression in brain endothelial cells with barrier properties. *J Cell Physiol* **203**, 362-371.
- Ginsberg M. D. (2008) Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* **55**, 363-389.
- Girouard H. and Iadecola C. (2006) Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol* **100**, 328-335.
- Giulian D. (1997) Immune responses and dementia. *Ann N Y Acad Sci* **835**, 91-110.
- Golden P. L. and Pardridge W. M. (1999) P-Glycoprotein on astrocyte foot processes of unfixed isolated human brain capillaries. *Brain Res* **819**, 143-146.
- Goldmann E. (1913) Vitalfärbung am zentral nerven system. Beitrag zur physiologie des plexus choroïdus und der hirnhaute. *Berlin*.
- Gonzalez R. G. (2006) Imaging-guided acute ischemic stroke therapy: From "time is brain" to "physiology is brain". *AJNR Am J Neuroradiol* **27**, 728-735.
- Gottardi C. J., Arpin M., Fanning A. S. and Louvard D. (1996) The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10779-10784.
- Green A. R. (2008) Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**, S325-338.
- Grieb P., Forster R. E., Strome D., Goodwin C. W. and Pape P. C. (1985) O₂ exchange between blood and brain tissues studied with 18O₂ indicator-dilution technique. *J Appl Physiol* **58**, 1929-1941.
- Gu Z., Kaul M., Yan B., Kridel S. J., Cui J., Strongin A., Smith J. W., Liddington R. C. and Lipton S. A. (2002) S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* **297**, 1186-1190.
- Guillemot L. and Citi S. (2006) Cingulin regulates claudin-2 expression and cell proliferation through the small GTPase RhoA. *Mol Biol Cell* **17**, 3569-3577.
- Gunnarson E., Zelenina M., Axehult G., Song Y., Bondar A., Krieger P., Brismar H., Zelenin S. and Aperia A. (2008) Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. *Glia* **56**, 587-596.
- Gursoy-Ozdemir Y., Can A. and Dalkara T. (2004) Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke* **35**, 1449-1453.

- Hagenbuch B. and Meier P. J. (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* **1609**, 1-18.
- Hall E. D. and Bosken J. M. (2009) Measurement of oxygen radicals and lipid peroxidation in neural tissues. *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 7**, Unit 7 17 11-51.
- Hallier-Vanuxeem D., Prieto P., Culot M., Diallo H., Landry C., Tahti H. and Cecchelli R. (2009) New strategy for alerting central nervous system toxicity: Integration of blood-brain barrier toxicity and permeability in neurotoxicity assessment. *Toxicol In Vitro* **23**, 447-453.
- Hanisch U. K. and Kettenmann H. (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* **10**, 1387-1394.
- Harrison J. F., Hollensworth S. B., Spitz D. R., Copeland W. C., Wilson G. L. and LeDoux S. P. (2005) Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Res* **33**, 4660-4671.
- Hasegawa H., Ma T., Skach W., Matthay M. A. and Verkman A. S. (1994) Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem* **269**, 5497-5500.
- Haskins J., Gu L., Wittchen E. S., Hibbard J. and Stevenson B. R. (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* **141**, 199-208.
- Hawkins B. T. and Davis T. P. (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **57**, 173-185.
- Hawkins R. A., O'Kane R. L., Simpson I. A. and Vina J. R. (2006) Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr* **136**, 218S-226S.
- Hayashi K., Nakao S., Nakaoka R., Nakagawa S., Kitagawa N. and Niwa M. (2004) Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul Pept* **123**, 77-83.
- Hellstrom M., Gerhardt H., Kalen M., Li X., Eriksson U., Wolburg H. and Betsholtz C. (2001) Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* **153**, 543-553.
- Heo J. H., Han S. W. and Lee S. K. (2005) Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med* **39**, 51-70.
- Herve F., Ghinea N. and Scherrmann J. M. (2008) CNS delivery via adsorptive transcytosis. *Aaps J* **10**, 455-472.
- Hirase T., Staddon J. M., Saitou M., Ando-Akatsuka Y., Itoh M., Furuse M., Fujimoto K., Tsukita S. and Rubin L. L. (1997) Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* **110 (Pt 14)**, 1603-1613.
- Hirrlinger J., Konig J. and Dringen R. (2002) Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J Neurochem* **82**, 716-719.
- Hori S., Ohtsuki S., Hosoya K., Nakashima E. and Terasaki T. (2004) A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem* **89**, 503-513.
- Hossmann K. A. (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* **36**, 557-565.
- Hossmann K. A. (1996) Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **8**, 195-208.
- Hossmann K. A. (2006) Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* **26**, 1057-1083.
- Hoyte L., Kaur J. and Buchan A. M. (2004) Lost in translation: taking neuroprotection from animal models to clinical trials. *Exp Neurol* **188**, 200-204.
- Huang J., Upadhyay U. M. and Tamargo R. J. (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral

- ischemia. *Surg Neurol* **66**, 232-245.
- Huang Z. G., Xue D., Preston E., Karbalai H. and Buchan A. M. (1999) Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia: effects of hypothermia. *Can J Neurol Sci* **26**, 298-304.
- Huber J. D., Egleton R. D. and Davis T. P. (2001) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* **24**, 719-725.
- Hynes R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
- Iadecola C. (1997) Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* **20**, 132-139.
- Iadecola C. (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **5**, 347-360.
- Iadecola C. and Nedergaard M. (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* **10**, 1369-1376.
- Inoue H., Jiang X. F., Katayama T., Osada S., Umesono K. and Namura S. (2003) Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice. *Neurosci Lett* **352**, 203-206.
- Inoue I., Goto S., Matsunaga T., Nakajima T., Awata T., Hokari S., Komoda T. and Katayama S. (2001) The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* **50**, 3-11.
- Itoh M., Furuse M., Morita K., Kubota K., Saitou M. and Tsukita S. (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* **147**, 1351-1363.
- Iwashita A., Muramatsu Y., Yamazaki T., Muramoto M., Kita Y., Yamazaki S., Mihara K., Moriguchi A. and Matsuoka N. (2007) Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor delta-selective agonists in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **320**, 1087-1096.
- Jaillard A., Cornu C., Durieux A., Moulin T., Boutitie F., Lees K. R. and Hommel M. (1999) Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. The MAST-E study. MAST-E Group. *Stroke* **30**, 1326-1332.
- Jasinska 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.
- Jian Liu K. and Rosenberg G. A. (2005) Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* **39**, 71-80.
- Jodoin J., Demeule M., Fenart L., Cecchelli R., Farmer S., Linton K. J., Higgins C. F. and Beliveau R. (2003) P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells: interaction and oligomerization with caveolins. *J Neurochem* **87**, 1010-1023.
- Johannes L. and Lamaze C. (2002) Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic* **3**, 443-451.
- Justicia C., Panes J., Sole S., Cervera A., Deulofeu R., Chamorro A. and Planas A. M. (2003) Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 1430-1440.
- Kahle K. T., Simard J. M., Staley K. J., Nahed B. V., Jones P. S. and Sun D. (2009) Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda)* **24**, 257-265.
- Kalinin S., Feinstein D. L., Xu H. L., Huesa G., Pelligrino D. A. and Galea E. (2006) Degeneration

- of noradrenergic fibres from the locus coeruleus causes tight-junction disorganisation in the rat brain. *Eur J Neurosci* **24**, 3393-3400.
- Kastrup A., Engelhorn T., Beaulieu C., de Crespigny A. and Moseley M. E. (1999) Dynamics of cerebral injury, perfusion, and blood-brain barrier changes after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* **166**, 91-99.
- Kelly M. A., Shuaib A. and Todd K. G. (2006) Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Exp Neurol* **200**, 38-49.
- Kidwell C. S., Latour L., Saver J. L., Alger J. R., Starkman S., Duckwiler G., Jahan R., Vinuela F., Kang D. W. and Warach S. (2008) Thrombolytic toxicity: blood brain barrier disruption in human ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* **25**, 338-343.
- Kielian T. and Drew P. D. (2003) Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation. *J Neurosci Res* **71**, 315-325.
- Kimelberg H. K., Bowman C., Biddlecome S. and Bourke R. S. (1979) Cation transport and membrane potential properties of primary astroglial cultures from neonatal rat brains. *Brain Res* **177**, 533-550.
- Kirino T. (2002) Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 1283-1296.
- Klatzo I. (1967) Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* **26**, 1-14.
- Koehler R. C., Gebremedhin D. and Harder D. R. (2006) Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol* **100**, 307-317.
- Koehler R. C., Roman R. J. and Harder D. R. (2009) Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci* **32**, 160-169.
- Kondo T., Kinouchi H., Kawase M. and Yoshimoto T. (1996) Astroglial cells inhibit the increasing permeability of brain endothelial cell monolayer following hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Lett* **208**, 101-104.
- Konradi C., Riederer P., Jellinger K. and Denney R. (1987) Cellular action of MAO inhibitors. *J Neural Transm Suppl* **25**, 15-25.
- Kontos H. A. (2001) Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. *Stroke* **32**, 2712-2716.
- Koto T., Takubo K., Ishida S., Shinoda H., Inoue M., Tsubota K., Okada Y. and Ikeda E. (2007) Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. *Am J Pathol* **170**, 1389-1397.
- Krupinski J., Lopez E., Marti E. and Ferrer I. (2000) Expression of caspases and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* **7**, 332-342.
- Kuhlmann C. R., Gerigk M., Bender B., Closhen D., Lessmann V. and Luhmann H. J. (2008) Fluvastatin prevents glutamate-induced blood-brain-barrier disruption in vitro. *Life Sci* **82**, 1281-1287.
- 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**, 1103-1120.
- Kunz A., Park L., Abe T., Gallo E. F., Anrather J., Zhou P. and Iadecola C. (2007) Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *J Neurosci* **27**, 7083-7093.
- Kuroiwa T., Ting P., Martinez H. and Klatzo I. (1985) The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol* **68**, 122-129.
- Kurosaki R., Muramatsu Y., Kato H. and Araki T. (2004) Protective effect of pitavastatin, a 3-

- hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor, on ischemia-induced neuronal damage. *Neurol Res* **26**, 684-691.
- Kusuhara H., Suzuki H., Naito M., Tsuruo T. and Sugiyama Y. (1998) Characterization of efflux transport of organic anions in a mouse brain capillary endothelial cell line. *J Pharmacol Exp Ther* **285**, 1260-1265.
- Lagrange P., Romero I. A., Minn A. and Revest P. A. (1999) Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med* **27**, 667-672.
- Lai C. H. and Kuo K. H. (2005) The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev* **50**, 258-265.
- Lai F. M., Udenfriend S. and Spector S. (1975) Presence of norepinephrine and related enzymes in isolated brain microvessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4622-4625.
- Lajoie P. and Nabi I. R. (2007) Regulation of raft-dependent endocytosis. *J Cell Mol Med* **11**, 644-653.
- Laufs U., Gertz K., Dirnagl U., Bohm 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.
- Laufs U., Gertz K., Huang P., Nickenig G., Bohm M., Dirnagl U. and Endres M. (2000) Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* **31**, 2442-2449.
- Lawrenson J. G., Reid A. R., Finn T. M., Orte C. and Allt G. (1999) Cerebral and pial microvessels: differential expression of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase. *Anat Embryol (Berl)* **199**, 29-34.
- Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart J. C. and Staels B. (2006) Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* **116**, 571-580.
- Leybaert L. (2005) Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 2-16.
- Leys D., Deplanque D., Mounier-Vehier C., Mackowiak-Cordoliani M. A., Lucas C. and Bordet R. (2002) Stroke prevention: management of modifiable vascular risk factors. *J Neurol* **249**, 507-517.
- Lin C. Y., Chang C., Cheung W. M., Lin M. H., Chen J. J., Hsu C. Y., Chen J. H. and Lin T. N. (2008) Dynamic changes in vascular permeability, cerebral blood volume, vascular density, and size after transient focal cerebral ischemia in rats: evaluation with contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 1491-1501.
- Lin S. Z., Chiou A. L. and Wang Y. (1996) Ketamine antagonizes nitric oxide release from cerebral cortex after middle cerebral artery ligation in rats. *Stroke* **27**, 747-752.
- Lin T. N., Sun S. W., Cheung W. M., Li F. and Chang C. (2002) Dynamic changes in cerebral blood flow and angiogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats. Evaluation with serial magnetic resonance imaging. *Stroke* **33**, 2985-2991.
- Liu P. K. (2003) Ischemia-reperfusion-related repair deficit after oxidative stress: implications of faulty transcripts in neuronal sensitivity after brain injury. *J Biomed Sci* **10**, 4-13.
- Liu X., Chi O. Z. and Weiss H. R. (2004) Effects of metabotropic glutamate receptor stimulation on blood-brain barrier permeability during focal cerebral ischemia. *Neurochem Res* **29**, 1857-1862.
- Lloyd-Jones D., Adams R., Carnethon M., De Simone G., Ferguson T. B., Flegal K., Ford E., Furie K., Go A., Greenlund K., Haase N., Hailpern S., Ho M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lackland D., Lisabeth L., Marelli A., McDermott M., Meigs J., Mozaffarian D., Nichol G.,

- O'Donnell C., Roger V., Rosamond W., Sacco R., Sorlie P., Stafford R., Steinberger J., Thom T., Wasserthiel-Smoller S., Wong N., Wylie-Rosett J. and Hong Y. (2009) Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **119**, 480-486.
- Lo E. H. (2008) Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**, S396-405.
- Longa E. Z., Weinstein P. R., Carlson S. and Cummins R. (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**, 84-91.
- Loscher W. and Potschka H. (2005) Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* **2**, 86-98.
- Losy J., Zaremba J. and Skrobanski P. (2005) CXCL1 (GRO-alpha) chemokine in acute ischaemic stroke patients. *Folia Neuropathol* **43**, 97-102.
- Love S. (2003) Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**, 267-282.
- Lu A., Clark J. F., Broderick J. P., Pyne-Geithman G. J., Wagner K. R., Ran R., Khatri P., Tomsick T. and Sharp F. R. (2008) Reperfusion activates metalloproteinases that contribute to neurovascular injury. *Exp Neurol* **210**, 549-559.
- Lum H. and Roebuck K. A. (2001) Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C719-741.
- Luo Y., Yin W., Signore A. P., Zhang F., Hong Z., Wang S., Graham S. H. and Chen J. (2006) Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *J Neurochem* **97**, 435-448.
- Luquet S., Gaudel C., Holst D., Lopez-Soriano J., Jehl-Pietri C., Fredenrich A. and Grimaldi P. A. (2005) Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* **1740**, 313-317.
- Mabuchi T., Kitagawa K., Ohtsuki T., Kuwabara K., Yagita Y., Yanagihara T., Hori M. and Matsumoto M. (2000) Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **31**, 1735-1743.
- Magistretti P. J. and Pellerin L. (1999) Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1155-1163.
- Mandarino L. J., Sundarraj N., Finlayson J. and Hassell H. R. (1993) Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp Eye Res* **57**, 609-621.
- Manley G. T., Fujimura M., Ma T., Noshita N., Filiz F., Bollen A. W., Chan P. and Verkman A. S. (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* **6**, 159-163.
- Mark K. S. and Davis T. P. (2002) Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H1485-1494.
- Mark K. S., Burroughs A. R., Brown R. C., Huber J. D. and Davis T. P. (2004) Nitric oxide mediates hypoxia-induced changes in paracellular permeability of cerebral microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H174-180.
- Martin-Padura I., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., Panzeri C., Stoppacciaro A., Ruco L., Villa A., Simmons D. and Dejana E. (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* **142**, 117-127.

- Martin G., Duez H., Blanquart C., Berezowski V., Poulain P., Fruchart J. C., Najib-Fruchart J., Glineur C. and Staels B. (2001) Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPAR α and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest* **107**, 1423-1432.
- Masada T., Hua Y., Xi G., Ennis S. R. and Keep R. F. (2001) Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 22-33.
- Mattson M. P., Culmsee C. and Yu Z. F. (2000) Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* **301**, 173-187.
- Mayhan W. G. and Didion S. P. (1996) Glutamate-induced disruption of the blood-brain barrier in rats. Role of nitric oxide. *Stroke* **27**, 965-969; discussion 970.
- McCabe C., Gallagher L., Gsell W., Graham D., Dominiczak A. F. and Macrae I. M. (2009) Differences in the Evolution of the Ischemic Penumbra in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats. *Stroke*.
- Méresse S., Dehouck M. P., Delorme P., Bensaid M., Tauber J. P., Delbart C., Fruchart J. C. and Cecchelli R. (1989) Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J Neurochem* **53**, 1363-1371.
- Meyer J., Mischeck U., Veyhl M., Henzel K. and Galla H. J. (1990) Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res* **514**, 305-309.
- 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., Palmer C. N., Plutzky J., Reddy J. K., Spiegelman B. M., Staels B. and Wahli W. (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* **58**, 726-741.
- Miecz D., Januszewicz E., Czeredys M., Hinton B. T., Berezowski V., Cecchelli R. and Nalecz K. A. (2008) Localization of organic cation/carnitine transporter (OCTN2) in cells forming the blood-brain barrier. *J Neurochem* **104**, 113-123.
- Milner R., Hung S., Wang X., Spatz M. and del Zoppo G. J. (2008) The rapid decrease in astrocyte-associated dystroglycan expression by focal cerebral ischemia is protease-dependent. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 812-823.
- Moncayo J., de Freitas G. R., Bogousslavsky J., Altieri M. and van Melle G. (2000) Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* **54**, 2089-2094.
- Moos T. and Morgan E. H. (2000) Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell Mol Neurobiol* **20**, 77-95.
- Moreno S., Farioli-Vecchioli S. and Ceru M. P. (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* **123**, 131-145.
- Morita K., Sasaki H., Furuse M. and Tsukita S. (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TM6VCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* **147**, 185-194.
- Mroczkowska J. E., Galla H. J., Nalecz M. J. and Nalecz K. A. (1997) Evidence for an asymmetrical uptake of L-carnitine in the blood-brain barrier in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **241**, 127-131.
- Murry C. E., Jennings R. B. and Reimer K. A. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124-1136.
- Mysiorek C., Culot M., Dehouck L., Derudas B., Staels B., Bordet R., Cecchelli R., Fenart L. and Berezowski V. (2009) Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor- α Activation Protects Brain Capillary Endothelial Cells from Oxygen-glucose Deprivation-induced Hyperpermeability in the Blood-brain Barrier. *Curr Neurovasc Res*.
- Nag S. (2003a) Pathophysiology of blood-brain barrier breakdown. *Methods Mol Med* **89**, 97-119.
- Nag S. (2003b) Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral

- vessels. *Methods Mol Med* **89**, 3-36.
- Nagel S., Wagner S., Koziol J., Kluge B. and Heiland S. (2004) Volumetric evaluation of the ischemic lesion size with serial MRI in a transient MCAO model of the rat: comparison of DWI and T1WI. *Brain Res Brain Res Protoc* **12**, 172-179.
- Nagel S., Su Y., Horstmann S., Heiland S., Gardner H., Koziol J., Martinez-Torres F. J. and Wagner S. (2008) Minocycline and hypothermia for reperfusion injury after focal cerebral ischemia in the rat: effects on BBB breakdown and MMP expression in the acute and subacute phase. *Brain Res* **1188**, 198-206.
- Nakagawa S., Deli M. A., Nakao S., Honda M., Hayashi K., Nakaoke R., Kataoka Y. and Niwa M. (2007) Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* **27**, 687-694.
- Nakazawa E. and Ishikawa H. (1998) Ultrastructural observations of astrocyte end-feet in the rat central nervous system. *J Neurocytol* **27**, 431-440.
- Nakka V. P., Gusain A., Mehta S. L. and Raghuram R. (2008) Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. *Mol Neurobiol* **37**, 7-38.
- Nasdala I., Wolburg-Buchholz K., Wolburg H., Kuhn A., Ebnet K., Brachtendorf G., Samulowitz U., Kuster B., Engelhardt B., Vestweber D. and Butz S. (2002) A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol Chem* **277**, 16294-16303.
- Nielsen S., Nagelhus E. A., Amiry-Moghaddam M., Bourque C., Agre P. and Ottersen O. P. (1997) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* **17**, 171-180.
- NINDS (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* **333**, 1581-1587.
- NINDS (1997) Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke* **28**, 2109-2118.
- Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M. and Tsukita S. (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* **161**, 653-660.
- Ohtsuki S. and Terasaki T. (2007) Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res* **24**, 1745-1758.
- Ohtsuki S., Takizawa T., Takanaga H., Hori S., Hosoya K. and Terasaki T. (2004) Localization of organic anion transporting polypeptide 3 (oatp3) in mouse brain parenchymal and capillary endothelial cells. *J Neurochem* **90**, 743-749.
- Okada Y., Copeland B. R., Mori E., Tung M. M., Thomas W. S. and del Zoppo G. J. (1994) P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* **25**, 202-211.
- Okouchi M., Okayama N., Omi H., Imaeda K., Shimizu M., Fukutomi T. and Itoh M. (2003) Cerivastatin ameliorates high insulin-enhanced neutrophil-endothelial cell adhesion and endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibiting mitogen-activated protein kinase activation. *J Diabetes Complications* **17**, 380-386.
- Ostermann G., Weber K. S., Zerneck A., Schroder A. and Weber C. (2002) JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol* **3**, 151-158.
- Ouk T., Laprais M., Bastide M., Gautier S., Mostafa K. and Bordet R. (2009) Withdrawal of fenofibrate treatment partially abrogates preventive neuroprotection in stroke via loss of vascular protection. *Vascul Pharmacol*.

- Overgaard K. (1994) Thrombolytic therapy in experimental embolic stroke. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **6**, 257-286.
- Paciaroni M., Caso V. and Agnelli G. (2009) The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *Eur Neurol* **61**, 321-330.
- Pantoni L., Sarti C. and Inzitari D. (1998) Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 503-513.
- Papadopoulos M. C., Manley G. T., Krishna S. and Verkman A. S. (2004) Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *Faseb J* **18**, 1291-1293.
- Pardridge W. M., Golden P. L., Kang Y. S. and Bickel U. (1997) Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. *J Neurochem* **68**, 1278-1285.
- 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.
- Payen J. F., Fauvage B., Falcon D. and Lavagne P. (2003) [Brain oedema following blood-brain barrier disruption: mechanisms and diagnosis]. *Ann Fr Anesth Reanim* **22**, 220-225.
- Peppiatt C. M., Howarth C., Mobbs P. and Attwell D. (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* **443**, 700-704.
- Pereira M. P., Hurtado O., Cardenas A., Alonso-Escolano D., Bosca L., Vivancos J., Nombela F., Leza J. C., Lorenzo P., Lizasoain I. and Moro M. A. (2005) The nonthiazolidinedione PPARgamma agonist L-796,449 is neuroprotective in experimental stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 797-805.
- Perry M. M. and Gilbert A. B. (1979) Yolk transport in the ovarian follicle of the hen (*Gallus domesticus*): lipoprotein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. *J Cell Sci* **39**, 257-272.
- Petty M. A. and Wettstein J. G. (2001) Elements of cerebral microvascular ischaemia. *Brain Res Brain Res Rev* **36**, 23-34.
- Plateel M., Teissier E. and Cecchelli R. (1997) Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J Neurochem* **68**, 874-877.
- Plateel M., Dehouck M. P., Torpier G., Cecchelli R. and Teissier E. (1995) Hypoxia increases the susceptibility to oxidant stress and the permeability of the blood-brain barrier endothelial cell monolayer. *J Neurochem* **65**, 2138-2145.
- 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.
- Qutub A. A. and Hunt C. A. (2005) Glucose transport to the brain: a systems model. *Brain Res Brain Res Rev* **49**, 595-617.
- Ramsauer M., Krause D. and Dermietzel R. (2002) Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *Faseb J* **16**, 1274-1276.
- Ramsauer M., Kunz J., Krause D. and Dermietzel R. (1998) Regulation of a blood-brain barrier-specific enzyme expressed by cerebral pericytes (pericytic aminopeptidase N/pAPN) under cell culture conditions. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 1270-1281.
- Rapoport S. (1976) Blood brain barrier in physiology and medicine.
- Raub T. J., Kuentzel S. L. and Sawada G. A. (1992) Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: barrier tightening by a factor released from astroglia cells. *Exp Cell Res* **199**, 330-340.
- Razani B., Woodman S. E. and Lisanti M. P. (2002) Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* **54**, 431-467.
- Reese T. S. and Karnovsky M. J. (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* **34**, 207-217.

- Ricote M. and Glass C. K. (2007) PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 926-935.
- Risau W. (1995) Differentiation of endothelium. *Faseb J* **9**, 926-933.
- Risau W., Dingler A., Albrecht U., Dehouck M. P. and Cecchelli R. (1992) Blood-brain barrier pericytes are the main source of gamma-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries. *J Neurochem* **58**, 667-672.
- Robinson M. S. (1994) The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 538-544.
- Rodriguez-Yanez M., Castellanos M., Blanco M., Mosquera E. and Castillo J. (2006) Vascular protection in brain ischemia. *Cerebrovasc Dis* **21 Suppl 2**, 21-29.
- Rosell A. and Lo E. H. (2008) Multiphasic roles for matrix metalloproteinases after stroke. *Curr Opin Pharmacol* **8**, 82-89.
- Rosell A., Cuadrado E., Ortega-Aznar A., Hernandez-Guillamon M., Lo E. H. and Montaner J. (2008) MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* **39**, 1121-1126.
- Rosenberg G. A. (1999) Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis* **42**, 209-216.
- Rosenberg G. A., Estrada E. Y. and Dencoff J. E. (1998) Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* **29**, 2189-2195.
- Rossi D. J., Brady J. D. and Mohr C. (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci* **10**, 1377-1386.
- Roussel B. D., Hommet Y., Macrez R., Schulz T., Petersen K. U., Berezowski V., Cecchelli R., Ali C. and Vivien D. (2009) PPACK-Desmodus rotundus salivary plasminogen activator (cDSPAalpha1) prevents the passage of tissue-type plasminogen activator (rt-PA) across the blood-brain barrier and neurotoxicity. *Thromb Haemost* **102**, 606-608.
- Rubin L. L., Hall D. E., Porter S., Barbu K., Cannon C., Horner H. C., Janatpour M., Liaw C. W., Manning K., Morales J. and et al. (1991) A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* **115**, 1725-1735.
- Saitou M., Furuse M., Sasaki H., Schulzke J. D., Fromm M., Takano H., Noda T. and Tsukita S. (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* **11**, 4131-4142.
- Sakakibara A., Furuse M., Saitou M., Ando-Akatsuka Y. and Tsukita S. (1997) Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* **137**, 1393-1401.
- Sandoval K. E. and Witt K. A. (2008) Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis* **32**, 200-219.
- Sandoval R., Malik A. B., Minshall R. D., Kouklis P., Ellis C. A. and Tiruppathi C. (2001) Ca(2+) signalling and PKCalpha activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions. *J Physiol* **533**, 433-445.
- Satoh H., Zhong Y., Isomura H., Saitoh M., Enomoto K., Sawada N. and Mori M. (1996) Localization of 7H6 tight junction-associated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier function against ions, large molecules, and cancer cells. *Exp Cell Res* **222**, 269-274.
- Saver J. L. (2006) Time is brain--quantified. *Stroke* **37**, 263-266.
- Saver J. L., Gornbein J., Grotta J., Liebeskind D., Lutsep H., Schwamm L., Scott P. and Starkman S. (2009) Number needed to treat to benefit and to harm for intravenous tissue plasminogen activator therapy in the 3- to 4.5-hour window: joint outcome table analysis of the ECASS 3 trial. *Stroke* **40**, 2433-2437.

- Scherrmann J. M. (2002) Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol* **38**, 349-354.
- Schinkel A. H. (1999) P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* **36**, 179-194.
- Schinkel A. H. and Jonker J. W. (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 3-29.
- Schmidt A., Goepfert C., Feitsma K. and Buddecke E. (2002) Lovastatin-stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF-alpha activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* **164**, 57-64.
- Schnitzer J. E., Oh P., Pinney E. and Allard J. (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* **127**, 1217-1232.
- Schousboe A., Bak L. K., Sickmann H. M., Sonnewald U. and Waagepetersen H. S. (2007) Energy substrates to support glutamatergic and GABAergic synaptic function: role of glycogen, glucose and lactate. *Neurotox Res* **12**, 263-268.
- Seta K. A., Yuan Y., Spicer Z., Lu G., Bedard J., Ferguson T. K., Pathrose P., Cole-Strauss A., Kaufhold A. and Millhorn D. E. (2004) The role of calcium in hypoxia-induced signal transduction and gene expression. *Cell Calcium* **36**, 331-340.
- Shepro D. and Morel N. M. (1993) Pericyte physiology. *Faseb J* **7**, 1031-1038.
- Shimazu T., Inoue I., Araki N., Asano Y., Sawada M., Furuya D., Nagoya H. and Greenberg J. H. (2005) A peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist reduces infarct size in transient but not in permanent ischemia. *Stroke* **36**, 353-359.
- Simard J. M., Kent T. A., Chen M., Tarasov K. V. and Gerzanich V. (2007) Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol* **6**, 258-268.
- Simionescu M. and Simionescu N. (1991) Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev* **25**, 1-78.
- Simpson I. A., Carruthers A. and Vannucci S. J. (2007) Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 1766-1791.
- Simpson I. A., Appel N. M., Hokari M., Oki J., Holman G. D., Maher F., Koehler-Stec E. M., Vannucci S. J. and Smith Q. R. (1999) Blood-brain barrier glucose transporter: effects of hypo- and hyperglycemia revisited. *J Neurochem* **72**, 238-247.
- Sims D. E. (1991) Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease. *Can J Cardiol* **7**, 431-443.
- 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-kB and ERK1/2 after permanent focal ischemia is abolished by simvastatin treatment. *Neurobiol Dis* **22**, 445-451.
- Somlyo A. P., Wu X., Walker L. A. and Somlyo A. V. (1999) Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **134**, 201-234.
- Song L., Ge S. and Pachter J. S. (2007) Caveolin-1 regulates expression of junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Blood* **109**, 1515-1523.
- Stenzel-Poore M. P., Stevens S. L. and Simon R. P. (2004) Genomics of preconditioning. *Stroke* **35**, 2683-2686.
- Stenzel-Poore M. P., Stevens S. L., Xiong Z., Lessov N. S., Harrington C. A., Mori M., Meller R., Rosenzweig H. L., Tobar E., Shaw T. E., Chu X. and Simon R. P. (2003) Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet* **362**, 1028-1037.

- Stern LS G. R. (1922) Les rapports entre le liquide céphalo-rachidien et les éléments nerveux de l'axe cérébrospinal. *Arch Inter Physiol* **17**, 391-488.
- Stevenson B. R., Siliciano J. D., Mooseker M. S. and Goodenough D. A. (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* **103**, 755-766.
- Stevenson B. R., Heintzelman M. B., Anderson J. M., Citi S. and Mooseker M. S. (1989) ZO-1 and cingulin: tight junction proteins with distinct identities and localizations. *Am J Physiol* **257**, C621-628.
- Strbian D., Durukan A., Pitkonen M., Marinkovic I., Tatlisumak E., Pedrono E., Abo-Ramadan U. and Tatlisumak T. (2008) The blood-brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience* **153**, 175-181.
- Sugiyama D., Kusuhara H., Taniguchi H., Ishikawa S., Nozaki Y., Aburatani H. and Sugiyama Y. (2003) Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem* **278**, 43489-43495.
- Sundararajan S., Gamboa J. L., Victor N. A., Wanderi E. W., Lust W. D. and Landreth G. E. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia. *Neuroscience* **130**, 685-696.
- Sussman J., Stokoe D., Ossina N. and Shtivelman E. (2001) Protein kinase B phosphorylates AHNAK and regulates its subcellular localization. *J Cell Biol* **154**, 1019-1030.
- Tagaya M., Haring H. P., Stuiiver I., Wagner S., Abumiya T., Lucero J., Lee P., Copeland B. R., Seiffert D. and del Zoppo G. J. (2001) Rapid loss of microvascular integrin expression during focal brain ischemia reflects neuron injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 835-846.
- Takahashi M. and Macdonald R. L. (2004) Vascular aspects of neuroprotection. *Neurol Res* **26**, 862-869.
- Tamai I., Sai Y., Kobayashi H., Kamata M., Wakamiya T. and Tsuji A. (1997) Structure-internalization relationship for adsorptive-mediated endocytosis of basic peptides at the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **280**, 410-415.
- Tarkowski E., Rosengren L., Blomstrand C., Wikkelso C., Jensen C., Ekholm S. and Tarkowski A. (1997) Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke. *Clin Exp Immunol* **110**, 492-499.
- Taylor C. J., Nicola P. A., Wang S., Barrand M. A. and Hladky S. B. (2006) Transporters involved in regulation of intracellular pH in primary cultured rat brain endothelial cells. *J Physiol* **576**, 769-785.
- Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M. M., Pastan I. and Willingham M. C. (1989) Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* **37**, 159-164.
- Tilling T., Korte D., Hoheisel D. and Galla H. J. (1998) Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J Neurochem* **71**, 1151-1157.
- Tilling T., Engelbertz C., Decker S., Korte D., Huwel S. and Galla H. J. (2002) Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures. *Cell Tissue Res* **310**, 19-29.
- Touyz R. M. and Schiffrin E. L. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol* **45**, 19-28.
- Umeda K., Matsui T., Nakayama M., Furuse K., Sasaki H., Furuse M. and Tsukita S. (2004) Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem* **279**, 44785-44794.
- Veltkamp R., Siebing D. A., Heiland S., Schoenfeldt-Varas P., Veltkamp C., Schwaninger M.

- and Schwab S. (2005) Hyperbaric oxygen induces rapid protection against focal cerebral ischemia. *Brain Res* **1037**, 134-138.
- Vestweber D., Winderlich M., Cagna G. and Nottebaum A. F. (2009) Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol* **19**, 8-15.
- Vigne P., Lopez Farre A. and Frelin C. (1994) Na(+)-K(+)-Cl- cotransporter of brain capillary endothelial cells. Properties and regulation by endothelins, hyperosmolar solutions, calyculin A, and interleukin-1. *J Biol Chem* **269**, 19925-19930.
- Vikman P., Ansar S., Henriksson M., Stenman E. and Edvinsson L. (2007) Cerebral ischemia induces transcription of inflammatory and extracellular-matrix-related genes in rat cerebral arteries. *Exp Brain Res* **183**, 499-510.
- Volk H., Potschka H. and Loscher W. (2005) Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables. *J Histochem Cytochem* **53**, 517-531.
- von Tell D., Armulik A. and Betsholtz C. (2006) Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* **312**, 623-629.
- Wang S., Lee S. R., Guo S. Z., Kim W. J., Montaner J., Wang X. and Lo E. H. (2006) Reduction of tissue plasminogen activator-induced matrix metalloproteinase-9 by simvastatin in astrocytes. *Stroke* **37**, 1910-1912.
- Wang X., Barone F. C., Aiyar N. V. and Feuerstein G. Z. (1997) Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats. *Stroke* **28**, 155-161; discussion 161-152.
- Wang X., Tsuji K., Lee S. R., Ning M., Furie K. L., Buchan A. M. and Lo E. H. (2004) Mechanisms of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke. *Stroke* **35**, 2726-2730.
- Weber C., Fraemohs L. and Dejana E. (2007) The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* **7**, 467-477.
- Webster K. A., Graham R. M., Thompson J. W., Spiga M. G., Frazier D. P., Wilson A. and Bishopric N. H. (2006) Redox stress and the contributions of BH3-only proteins to infarction. *Antioxid Redox Signal* **8**, 1667-1676.
- Weih M., Kallenberg K., Bergk A., Dirnagl U., Harms L., Wernecke K. D. and Einhaupl K. M. (1999) Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke* **30**, 1851-1854.
- Willam C., Schindler R., Frei U. and Eckardt K. U. (1999) Increases in oxygen tension stimulate expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human endothelial cells. *Am J Physiol* **276**, H2044-2052.
- Williams L. R. and Leggett R. W. (1989) Reference values for resting blood flow to organs of man. *Clin Phys Physiol Meas* **10**, 187-217.
- Willis C. L., Nolan C. C., Reith S. N., Lister T., Prior M. J., Guerin C. J., Mavroudis G. and Ray D. E. (2004) Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood-brain barrier in the apparent absence of direct astrocytic contact. *Glia* **45**, 325-337.
- Witt K. A., Mark K. S., Hom S. and Davis T. P. (2003) Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H2820-2831.
- Witt K. A., Mark K. S., Huber J. and Davis T. P. (2005) Hypoxia-inducible factor and nuclear factor kappa-B activation in blood-brain barrier endothelium under hypoxic/reoxygenation stress. *J Neurochem* **92**, 203-214.
- Woitzik J., Schneider U. C., Thome C., Schroeck H. and Schilling L. (2006) Comparison of

- different intravascular thread occlusion models for experimental stroke in rats. *J Neurosci Methods* **151**, 224-231.
- Wolburg H. and Lippoldt A. (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* **38**, 323-337.
- Wolburg H., Noell S., Mack A., Wolburg-Buchholz K. and Fallier-Becker P. (2009) Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* **335**, 75-96.
- Wolburg H., Neuhaus J., Kniesel U., Krauss B., Schmid E. M., Ocalan M., Farrell C. and Risau W. (1994) Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* **107 (Pt 5)**, 1347-1357.
- Wolburg H., Wolburg-Buchholz K., Kraus J., Rascher-Eggstein G., Liebner S., Hamm S., Duffner F., Grote E. H., Risau W. and Engelhardt B. (2003) Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* **105**, 586-592.
- Wolff J. E., Munstermann G., Grebenkamper K. and Erben M. (1998) Gamma-glutamyl transpeptidase does not act as a cystine transporter in brain microvessels. *Neurochem Res* **23**, 1175-1178.
- Wu X. D., Du L. N., Wu G. C. and Cao X. D. (2001) Effects of electroacupuncture on blood-brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion in rat. *Acupunct Electrother Res* **26**, 1-9.
- Xu Z. Y., Liu H. D., Lau L. T., Yingge Z., Zhao R., Tong G. L., Chan P. H. and Yu A. C. (2009) Responses of astrocyte to simultaneous glutamate and arachidonic acid treatment. *Neurochem Int* **55**, 143-150.
- Yamamoto T., Maruyama W., Kato Y., Yi H., Shamoto-Nagai M., Tanaka M., Sato Y. and Naoi M. (2002) Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm* **109**, 1-13.
- Yancopoulos G. D., Davis S., Gale N. W., Rudge J. S., Wiegand S. J. and Holash J. (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**, 242-248.
- Yepes M., Roussel B. D., Ali C. and Vivien D. (2009) Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci* **32**, 48-55.
- Yu A. C., Wong H. K., Yung H. W. and Lau L. T. (2001) Ischemia-induced apoptosis in primary cultures of astrocytes. *Glia* **35**, 121-130.
- Zacco A., Togo J., Spence K., Ellis A., Lloyd D., Furlong S. and Piser T. (2003) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci* **23**, 11104-11111.
- Zahler S., Kupatt C. and Becker B. F. (2000) Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF-alpha. *Faseb J* **14**, 555-564.
- Zeng X. N., Sun X. L., Gao L., Fan Y., Ding J. H. and Hu G. (2007) Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci* **34**, 34-39.
- Zhang F., Xu S. and Iadecola C. (1995) Time dependence of effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* **15**, 595-601.
- Zhang F. Y., Chen X. C., Ren H. M. and Bao W. M. (2006) Effects of ischemic preconditioning on blood-brain barrier permeability and MMP-9 expression of ischemic brain. *Neurol Res* **28**, 21-24.
- Zhang L., Zhang Z. G., Zhang C., Zhang R. L. and Chopp M. (2004) Intravenous administration of a GPIIb/IIIa receptor antagonist extends the therapeutic window of intra-arterial tenecteplase-tissue plasminogen activator in a rat stroke model. *Stroke* **35**, 2890-2895.

- Zhang R., Chopp M., Zhang Z., Jiang N. and Powers C. (1998) The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* **785**, 207-214.
- Zhang W., Smith C., Howlett C. and Stanimirovic D. (2000) Inflammatory activation of human brain endothelial cells by hypoxic astrocytes in vitro is mediated by IL-1beta. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 967-978.
- Zhang W., Smith C., Shapiro A., Monette R., Hutchison J. and Stanimirovic D. (1999) Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* **101**, 148-160.
- Zhang Y. and Bhavnani B. R. (2006) Glutamate-induced apoptosis in neuronal cells is mediated via caspase-dependent and independent mechanisms involving calpain and caspase-3 proteases as well as apoptosis inducing factor (AIF) and this process is inhibited by equine estrogens. *BMC Neurosci* **7**, 49.
- Zhang Z. G., Zhang L., Croll S. D. and Chopp M. (2002) Angiotensin-1 reduces cerebral blood vessel leakage and ischemic lesion volume after focal cerebral embolic ischemia in mice. *Neuroscience* **113**, 683-687.
- Zhao B. Q., Wang S., Kim H. Y., Storrie H., Rosen B. R., Mooney D. J., Wang X. and Lo E. H. (2006a) Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med* **12**, 441-445.
- Zhao X., Ou Z., Grotta J. C., Waxham N. and Aronowski J. (2006b) Peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) activation protects neurons from NMDA excitotoxicity. *Brain Res* **1073-1074**, 460-469.
- Zhong Y., Saitoh T., Minase T., Sawada N., Enomoto K. and Mori M. (1993) Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol* **120**, 477-483.
- Zhou S. G., Lei X. Y. and Liao D. F. (2003) [Effects of hypoxic preconditioning on the adhesion of neutrophils to vascular endothelial cells induced by hypoxia/reoxygenation]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* **15**, 159-162.
- Zlokovic B. V. (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**, 178-201.
- Zonta M., Angulo M. C., Gobbo S., Rosengarten B., Hossmann K. A., Pozzan T. and Carmignoto G. (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* **6**, 43-50.
- Zozulya A., Weidenfeller C. and Galla H. J. (2008) Pericyte-endothelial cell interaction increases MMP-9 secretion at the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res* **1189**, 1-11.