

La barrière hémato-encéphalique lors de l'ischémie cérébrale : une cible thérapeutique

Vincent Bérézowski^{1,2,3,4,5}, Caroline Mysiorek^{1,2,3,4,5}, Mélanie Kuntz^{1,2,3,4,5}, Olivier Pétrault^{1,2,3,4,5} et Roméo Cecchelli^{1,2,3,4,5}

¹ Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France

² Université d'Artois, LBHE, EA 2465, 62300 Lens, France

³ IMPRT-IFR114, 59000 Lille, France

⁴ Laboratoire de Physiopathologie de la Barrière Hémato-Encéphalique (EA 2465), Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France

⁵ Université d'Artois, Faculté des Sciences Jean Perrin, rue Jean Souvraz, S.P.18, 62307 Lens Cedex, France

Auteur correspondant : Vincent Bérézowski, vincent.berezowski@univ-artois.fr

Reçu le 13 décembre 2011

Résumé – Depuis la preuve de son existence et de son rôle protecteur cérébral, la barrière hémato-encéphalique (BHE), caractérisée par la perméabilité restreinte des cellules endothéliales des capillaires cérébraux, représente un obstacle pour 95 % des futurs médicaments à visée centrale. À l'heure actuelle, une dysfonction de la BHE est trouvée dans un nombre croissant de pathologies telles que les accidents vasculaires cérébraux ischémiques, dont la seule thérapie, une thrombolyse pharmacologique, est limitée à quelques pour cent des patients admis, à cause des effets toxiques des thrombolytiques. Et depuis l'échec clinique de composés neuroprotecteurs prometteurs, de nombreuses études sur l'ischémie cérébrale ont été menées, avec des approches physiopathologiques ou pharmacologiques recentrées sur la BHE dont la complexité structurale s'est élargie à l'ensemble des cellules périvasculaires qui forment une unité fonctionnelle appelée unité neurovasculaire (UNV). Et pourtant, malgré l'identification de nombreux mécanismes moléculaires, le processus de dysfonction de la BHE au décours de l'ischémie/reperfusion demeure insuffisamment décrypté à l'heure actuelle pour expliquer l'action pléiotrope de nouveaux composés pharmacologiques qui pourraient protéger toute l'UNV et représenter de nouveaux traitements.

Mots clés : Barrière hémato-encéphalique / ischémie / endothélium / glie / protection vasculaire

Abstract – Dysfunction of the blood-brain barrier during ischaemia: a therapeutic concern.

Since it was discovered and its brain-protective role characterized, the blood-brain barrier (BBB), through the permeability-restricting action of the brain capillary endothelial cells, has been representing a hurdle for 95% of new medical compounds targeting the central nervous system. Recently, a BBB dysfunction is being found in an increasing number of pathologies such as brain ischaemic stroke, whose only therapy consists in a pharmacological thrombolysis limited to a small percentage of the admitted patients, because of the toxic effects of thrombolytics. And since the clinical failure of promising neuroprotectants, numerous studies of brain ischaemia were carried out, with physiopathological or pharmacological approaches refocused on the BBB, whose structural complexity is now expanded to perivascular cells, all forming a functional unit named the neurovascular unit (NVU). Nevertheless, in spite of the numerous molecular mechanisms identified, the process of BBB dysfunction in the ischaemia/reperfusion cascade remains insufficiently established to explain the

pleiotropic action exerted by new pharmacological compounds, possibly protecting the entire NVU and representing potential treatments.

Key words: Blood-brain barrier / ischaemia / endothelium / glia / vascular protection

Abréviations

AVC :	accident vasculaire cérébral
ABC :	<i>ATP-binding cassette</i>
BHE :	barrière hémato-encéphalique
DSPA :	desmotéplase
γ -GT :	gamma-glutamyl transpeptidase
iNOS :	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
JAM :	<i>junctional adhesion molecules</i>
LCR :	liquide céphalo-rachidien
LRP :	<i>low-density lipoprotein-receptor-related protein</i>
MAO :	monoamine oxydase
MRP :	protéine de multi-résistance
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
PDGF :	facteur de croissance dérivé des plaquettes
P-gp :	P-glycoprotéine
PPAR :	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
rtPA :	activateur tissulaire recombinant du plasminogène
SLC :	<i>solute carrier</i>
SNC :	système nerveux central
tPA :	activateur tissulaire du plasminogène
UNV :	unité neurovasculaire
VEGF :	<i>vascular endothelial growth factor</i>
ZO :	<i>zonula occludens</i>

La BHE et l'ischémie cérébrale

Historique et définition de la BHE

Alors qu'il y a plus d'un siècle les travaux d'Ehrlich et de Goldmann avaient établi l'existence d'une barrière entre le sang et le cerveau, la démonstration pourtant claire de sa localisation au niveau des capillaires cérébraux fait encore débat de nos jours.

En 1885, le pharmacologiste Paul Ehrlich montre qu'après injection d'un colorant vital dans la circulation de souris, tous les organes sont colorés excepté le cerveau (Erlich, 1885). Il en conclut que ce colorant ne présentait pas d'affinité pour ce tissu. Ignorée pendant plusieurs années, l'expérience de Goldmann réfutait pourtant cet argument : dès 1913, Edwin Goldmann montre que le bleu Trypan, injecté directement dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), se fixe et colore la totalité du cerveau (Goldmann, 1913). Ceci démontrait non seulement que le colorant était affiné pour le cerveau mais qu'il pouvait y diffuser largement. Ces expériences déterminaient donc sans équivoque que la barrière est localisée au niveau des vaisseaux cérébraux, limitant les échanges entre le sang et SNC.

Le terme de barrière hémato-encéphalique (BHE) fut cité pour la première fois dans la littérature

française en 1922 par Stern et Gautier qui la définissaient comme « un mécanisme spécial réglant le passage de diverses substances du sang dans le liquide céphalo-rachidien et dans les centres nerveux cérébraux spinaux » et la localisaient au niveau des plexus choroïdes, en réponse au dogme de l'époque établissant que toute substance injectée dans le sang ne peut pénétrer dans le SNC que si elle atteint le LCR par le biais des plexus choroïdes (Lewandowsky, 1900). Et, malgré les travaux de Walter and Spatz qui ont ébranlé cette notion de voie unique d'échange pour définir les trois barrières cérébrales actuelles (arachnoïdienne, hémato-liquidiennne, et hémato-encéphalique) (Spatz, 1933; Walter, 1933), et la démonstration de Reese & Karnovsky (1967) et de Brightman & Reese (1969) qui ont repris les expériences de Goldmann en injectant des traceurs visualisables en microscopie électronique pour montrer que l'endothélium des capillaires cérébraux constitue l'élément anatomique de la BHE, l'importance des capillaires cérébraux dans le transport des substances vers le cerveau fut sujet à controverses. C'est leur surface, estimée à 5000 fois celle des plexus choroïdes (Crone, 1971), qui a finalement désigné les capillaires cérébraux comme le site principal d'échange entre le sang et le SNC.

Depuis lors s'accroissent les preuves que l'endothélium des capillaires cérébraux présente des caractéristiques structurales et métaboliques différentes de celles de l'endothélium capillaire des autres organes. Cependant, la difficulté qui réside dans l'observation distincte des capillaires *in vivo* parmi les artérioles et les veinules, et dans la mise en place de cultures pures de cellules endothéliales de capillaires, pousse de nombreuses équipes de recherche à focaliser leurs travaux sur les microvaisseaux cérébraux. Ainsi cette localisation, repérée en premier lieu grâce aux avancées techniques, est confirmée par les données récentes de la physiopathologie de l'endothélium cérébral, remettant en cause la définition même de la BHE.

La BHE est maintenant connue comme une interface dynamique qui, en régulant les échanges de substances entre le sang et le cerveau, maintient des conditions optimales pour la fonction neuronale et gliale. Sélective et complexe (figure 1), la BHE est formée par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux en étroite association avec des cellules périvasculaires mésodermiques comme les péricytes, mais aussi des cellules nerveuses comme les cellules gliales, en particulier les astrocytes, qui forment un manchon continu de prolongements autour du

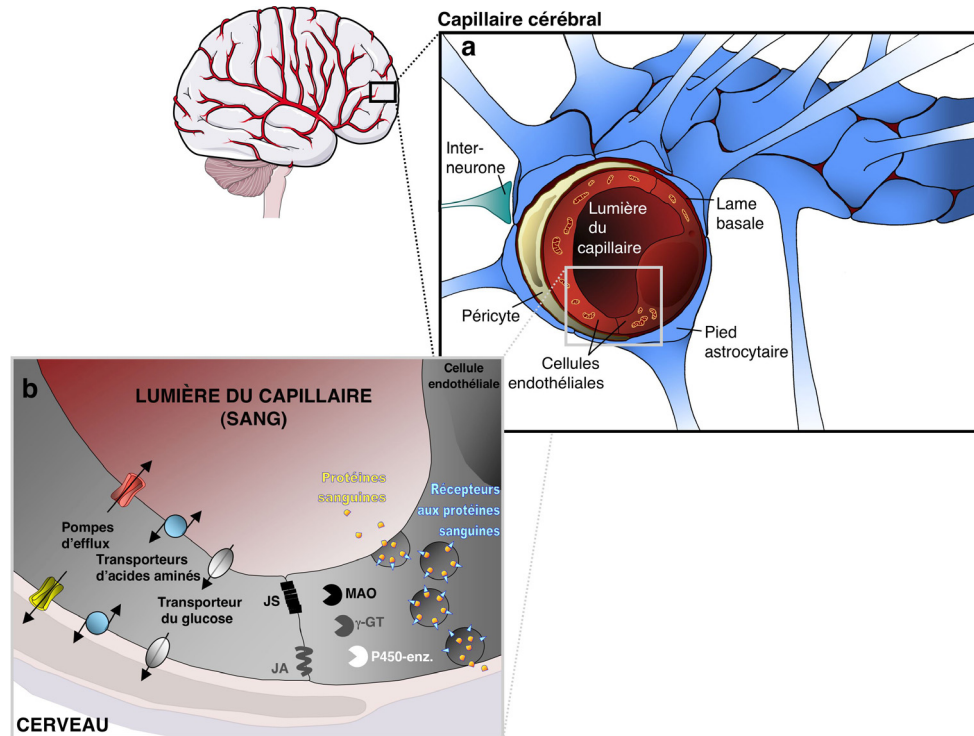


Fig. 1. La barrière hémato-encéphalique : organisation cellulaire (a) et propriétés (b) (modifié de Cecchelli *et al.*, 2007). MAO : monoamine oxydase ; γ -GT : gamma-glutamyl transpeptidase ; P450-enz. : enzymes associées au cytochrome P450.

capillaire, et les neurones périvasculaires (Cecchelli *et al.*, 2007).

Leur interaction en conditions physiologiques et leur réponse coordonnée aux situations pathologiques ont mené au concept selon lequel ces cellules forment une unité fonctionnelle appelée unité neurovasculaire (UNV) (Iadecola, 2004). Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux présentent des caractéristiques structurales et métaboliques qui différencient cet endothélium capillaire de celui des autres organes. Elles sont extrêmement 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, 2003). Les cellules endothéliales cérébrales se caractérisent également par une faible densité de vacuoles d'endocytose (Begley & Brightman, 2003) et par l'absence de canaux transendothéliaux (Reese & Karnovsky, 1967). L'endothélium est totalement entouré par la lame basale qui lui sert de support. Cette lame basale est produite par les cellules qui y sont apposées : les cellules endothéliales et les péricytes (Mandarinio *et al.*, 1993). Elle est constituée d'un complexe protéique servant de support aux interactions cellulaires. Ces cellules sont également polarisées et présentent des

jonctions intercellulaires spécifiques. Elles forment, en plus des jonctions adhérentes établissant les contacts cellule-cellule, un complexe de jonctions serrées issu de l'association de plusieurs protéines transmembranaires qui scellent la voie paracellulaire. Les protéines transmembranaires identifiées en tant que contributeurs principaux aux jonctions serrées sont l'occludine, les claudines et les molécules d'adhérence jonctionnelles connues sous le nom de *junctional adhesion molecules* (JAM). Un certain nombre de protéines cytoplasmiques comprenant la *Zonula Occludens-1* (ZO-1), la ZO-2, la cinguline et d'autres, joignent les protéines transmembranaires au cytosquelette d'actine, permettant au transport paracellulaire d'être modulé en réponse à différents stimuli (Huber *et al.*, 2001 ; Ballabh *et al.*, 2004). En dépit d'une longueur totale estimée à 650 km et d'une superficie totale de 10 à 20 m² de capillaires dans le cerveau humain, l'ensemble de ces propriétés physiques de la BHE rendent le cerveau pratiquement inaccessible aux molécules polaires, à moins qu'elles ne passent par des voies de transport de la BHE dédiées à la régulation du micro-environnement cérébral (Bradbury, 1976 ; Pardridge, 1991, 1992). En outre, la présence des enzymes intracellulaires et extracellulaires comme la monoamine oxydase (MAO), la gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT), la phosphatase alcaline, des peptidases, des nucléotidases et plusieurs enzymes

associées au cytochrome P450, dote cette interface dynamique d'une activité métabolique (Gherzi-Egea *et al.*, 1994; el-Bacha & Minn, 1999). Une autre caractéristique saisissante de la BHE est que les pieds astrocytaires entourent presque totalement les vaisseaux sanguins intra-parenchymateux (Maynard *et al.*, 1957; Jones, 1970). Ces pieds astrocytaires présentent une forte densité de récepteurs purinergiques P2Y, de canaux potassiques et de canaux hydriques de type aquaporine-4, ce qui suggère qu'ils ont un rôle important dans la signalisation gliovasculaire (Simard *et al.*, 2003) et dans la régulation de la perméabilité cérébrale à l'eau. De plus, les astrocytes participent au métabolisme énergétique neuronal et à la fonction synaptique. Des projections neuronales sont également étroitement associées à l'arbre vasculaire cérébral et des neurotransmetteurs, libérés par les neurones, peuvent déclencher une réponse des astrocytes menant au relargage périvasculaire d'agents vasoactifs qui participent à la signalisation neurovasculaire (Newman, 2003; Pellerin & Magistretti, 2003; Iadecola, 2004). Les astrocytes sont aussi fortement impliqués dans l'induction de nombreuses caractéristiques de la BHE comme les jonctions serrées, les systèmes enzymatiques spécialisés, et l'expression polarisée de transporteurs (DeBault & Cancilla, 1980; Dehouck *et al.*, 1994; Wolburg *et al.*, 1994; Haseloff *et al.*, 2005; Abbott *et al.*, 2006). Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux contiennent au niveau de leurs membranes lumineales et ablumineales de nombreux transporteurs qui régulent le trafic transcellulaire de molécules essentielles entre le cerveau et le sang, et expulsent les substances exogènes potentiellement nocives et les métabolites (figure 1b). Les grosses molécules telles que les anticorps, les lipoprotéines, ou d'autres protéines et peptides peuvent également être transférées vers le compartiment cérébral par transcytose médiée par récepteur ou par une transcytose non spécifique par adsorption. Bien que l'endothélium cérébral ait une activité d'endocytose/transcytose bien inférieure à celle de l'endothélium périphérique, il s'avère que ces mécanismes de transport peuvent s'intensifier sensiblement au niveau de la BHE dans des conditions pathologiques (Joo, 1971; Povlishock *et al.*, 1978; Hirano *et al.*, 1994; Brillault *et al.*, 2002; Benchenane *et al.*, 2005b). Une grande variété de molécules joue au niveau de la BHE le rôle de transporteurs d'acides aminés, du glucose, des nutriments, des électrolytes, des hormones et des peptides; leur fonction est polarisée dans le sens sang-cerveau et/ou cerveau-sang. Les transporteurs (pompes) d'efflux ont un intérêt particulier pour les stratégies de délivrance des médicaments au SNC : la P-glycoprotéine (P-gp) et la famille des protéines associées au phénotype de multi-résistance aux anticancéreux (MRP) (figure 1b). La P-gp, codée par le gène de multi-résistance aux

anticancéreux *MDR1*, est un transporteur membranaire actif énergie-dépendant de 170 kDa qui appartient à la superfamille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*), également nommé ABCB1 depuis qu'il est classé parmi les sous-types B de transporteurs ABC (ABCB) (Scherrmann, 2005). Les substrats de la P-gp incluent une grande variété d'agents anti-néoplasiques naturels tels que les anthracyclines, des vinca-alcaloïdes et les taxanes, mais aussi des agents immunosuppresseurs, des inhibiteurs de protéase, des antibiotiques et des glycosides cardiaques (Cordon-Cardo *et al.*, 1989; Jette *et al.*, 1995; Begley, 2004). Le mécanisme exact par lequel la P-gp expulse ses substrats du cytoplasme des cellules semble n'avoir trouvé une explication que très récemment (Aller *et al.*, 2009). La deuxième sous-famille de pompes d'efflux, qui appartient également à la superfamille des transporteurs ABC (ABCC), et qui peut conférer une multi-résistance aux anticancéreux, est la famille des MRP. Jusqu'à aujourd'hui, la famille des MRP de mammifère se compose de plus de dix protéines (Schinkel & Jonker, 2003; Kruh *et al.*, 2007) et la plupart des cellules paraissent exprimer de multiples membres de la famille avec des niveaux élevés d'un élément généralement dominant. MRP1 et MRP5 semblent être ubiquitaires, tous deux exprimés au niveau de la BHE et adressés soit à la membrane abluminale (basolatérale) (Schinkel & Jonker, 2003) soit à la membrane lumineale (apicale) (Zhang *et al.*, 2004; Soontornmalai *et al.*, 2006), contrairement à la P-gp généralement localisée au niveau luminal. MRP1 est de loin le membre le mieux caractérisé de la famille, et est impliqué dans la résistance à un certain nombre d'agents anticancéreux. Il semble y avoir beaucoup de similitudes fonctionnelles avec la P-gp bien que ces deux molécules présentent une homologie en acides aminés de seulement 15 %. Le profil d'expression et la localisation cellulaire des protéines MRP demeurent controversés à cause des différences d'espèces, et du fait qu'il est techniquement difficile de localiser ces protéines dans l'environnement cellulaire complexe de la BHE (Dallas *et al.*, 2006; Soontornmalai *et al.*, 2006). Alors que l'expression de MRP1 et MRP5 a été détectée dans des cellules endothéliales cérébrales de rat, de souris et d'humain tout comme la P-gp, le niveau d'expression semble très dépendant des procédés d'isolement et des systèmes cellulaires utilisés. De même que pour la P-gp, MRP6, un membre relativement nouveau de la famille des MRP, semble également être exprimé dans l'endothélium de la BHE et régulé positivement par la présence des cellules gliales (Fénart *et al.*, 1998; Bérézowski *et al.*, 2004). D'un point de vue fonctionnel, la signification de ces transporteurs au niveau de la BHE semble complexe puisqu'il a été suggéré que seule une position lumineale (apicale) confère à une pompe d'efflux un rôle

protecteur (Borst *et al.*, 2000; Loscher & Potschka, 2005). Le rôle d'une pompe d'efflux localisée au niveau abluminal (basolatéral) de la BHE, expulsant donc les composés vers le compartiment abluminal (cérébral), semblable à ce qui est observé dans des cellules rénales polarisées, n'est pas clair (Evers *et al.*, 1996). D'ailleurs, certains transporteurs de solutés, membres de la famille de transporteurs SLC (*solute carriers*), également connus sous le nom de transporteurs d'anions organiques ou de cations organiques (respectivement OAT et OCT), localisés à la membrane abluminale, se sont montrés capables d'agir de concert avec des membres luminaux de la famille de transporteurs ABC pour évacuer des composés du cerveau vers le sang (Kusuhara & Sugiyama, 2005). Il a été observé qu'un autre membre de la famille ABC, nommé ABCG2, a une fonction significative dans l'activité d'efflux de la BHE mais jusqu'ici l'impact potentiel de cette molécule sur la distribution cérébrale de substances *in vivo* est mal connu (Eisenblatter *et al.*, 2003).

Physiopathologie et évolution du concept de BHE

Cet ensemble de propriétés a déjà fait évoluer le concept de barrière filtrante en conférant à l'endothélium des capillaires cérébraux un rôle d'interface dynamique vis-à-vis des molécules apportées par le flux sanguin et des molécules issues du parenchyme cérébral. D'ailleurs, en raison de ces propriétés filtrantes, la régulation des mouvements d'eau de part et d'autre de la membrane capillaire cérébrale obéit à une loi de Starling modifiée (Payen *et al.*, 2003). Classiquement exprimée par l'équation suivante : $Q = K(\Delta P - \sigma_\pi \Delta \Pi)$, Q étant le débit de filtration à travers le capillaire et K , 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 cérébral, avec σ_π le coefficient de réflexion des protéines plasmatiques sur la paroi capillaire. Appliquée aux capillaires de la BHE, l'équation 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, 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 devient alors : $Q = K(\Delta P - \sigma_\pi \Delta \Pi - \sigma_\alpha \Delta \pi)$. Quand la BHE est intacte, ces deux coefficients de réflexion sont proches de 1, car les capillaires cérébraux sont pratiquement imperméables à la fois aux protéines et aux autres solutés plasmatiques. Le gradient de pression hydrostatique ΔP , modulé par le coefficient de filtration K , est une force qui favorise la sortie d'eau

du capillaire, tandis que le gradient de pression osmotique total (des protéines $\Delta \Pi$ et des autres solutés plasmatiques $\Delta \pi$) 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 en solution (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ...) puisque la BHE leur est très peu perméable, et leur pouvoir osmotique (285 mOsm.kg^{-1}) largement supérieur à celui des protéines circulantes (1 mOsm.kg^{-1}). 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. Par exemple, ceci se réalise 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 transendothélial des ions est alors possible 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. Ces deux phases induisent respectivement une variation des coefficients de réflexion σ_α et σ_π dont les valeurs tendent vers zéro, ce qui limite l'impact des gradients de pression osmotique puis oncotique. Le flux net est alors en faveur d'un mouvement d'eau et d'éléments sanguins vers le parenchyme cérébral conduisant à l'apparition d'un œdème. De plus, chaque segment de l'arbre microvasculaire présente des altérations de sa structure qui influencent cet équilibre et donc la perméabilité capillaire, telles qu'une modification de la pression hydrostatique liée à la chute du débit sanguin au niveau des artérioles lors de l'occlusion, ou encore la transmigration leucocytaire au niveau des veinules lors de l'inflammation. Cette complexité physiologique due aux interventions spécifiques de chaque segment de l'arbre vasculaire cérébral s'ajoute à celle qui est déjà rapportée par de nombreux travaux à propos des cellules qui entourent la BHE et qui constituent l'UNV. Cette unité fonctionnelle est d'ailleurs le plus souvent évoquée dans le cadre d'une pathologie, comme l'ischémie cérébrale (Endres *et al.*, 2008).

Bien que toujours variable en échelle de temps selon les patients et les modèles expérimentaux, la cinétique de l'altération de la BHE lors de l'ischémie commence à se dessiner dans les revues (Fagan *et al.*, 2004; Sandoval & Witt, 2008). Les mécanismes cellulaires et les acteurs moléculaires sous-jacents ont en revanche du mal à se placer avec précision dans le processus physiopathologique. Jusqu'à une époque récente, le concept de BHE était lié à l'apparition de l'œdème cérébral vasogénique, c'est-à-dire que la BHE

était considérée comme résultant d'une altération physique tardive de l'endothélium, qui provoquait un transfert d'eau du compartiment intravasculaire au compartiment extravasculaire (Ayata & Ropper, 2002). L'œdème vasogénique faisait donc suite à l'œdème cytotoxique précoce, censé être indépendant de l'altération de la BHE et de l'augmentation du volume cérébral à l'origine des dommages observés en clinique. Pourtant classé depuis longtemps en différents types (Klatzo, 1967), c'est seulement depuis peu que l'œdème cérébral est conçu comme un processus organisé dans le temps. Cette conception, encore théorique, va bouleverser quelques principes bien ancrés (Kahle *et al.*, 2009).

En effet, l'œdème cytotoxique serait le point de départ d'une cascade d'événements menant à un œdème ionique, puis à l'œdème vasogénique, et enfin éventuellement à l'hémorragie. Lors de l'ischémie, l'épuisement énergétique provoque des perturbations des processus de transport transmembranaires dépendants de l'ATP (Ca^{2+} -ATPase, Na^+ - K^+ -ATPase...), qui normalement régulent le volume cytoplasmique et son contenu en solutés. Ceci facilite l'entrée de sodium et d'autres solutés osmotiquement actifs dans le cytoplasme, par l'intermédiaire de systèmes de transport passif mais aussi actif secondaire ou même primaire, selon le degré d'épuisement en ATP et en énergie issue des gradients ioniques transmembranaires. L'eau suit ces solutés en passant de l'espace extracellulaire vers l'espace intracellulaire, ce qui provoque un gonflement cellulaire, l'œdème cytotoxique. Ce dernier concerne les astrocytes pour une large part, en vertu de leur proportion de 20:1 par rapport aux neurones, mais se trouve accéléré dans les neurones par des médiateurs comme le glutamate, connus pour se fixer au récepteur au N-méthyl-D-aspartate (NMDA), lui-même couplé à des canaux sodiques et calciques voltage-dépendants. Faiblement éliminé de l'espace synaptique lors de l'ischémie, le glutamate en excès provoque une entrée massive de calcium, de sodium puis d'eau dans le neurone, menant à un œdème cellulaire dit excitotoxique. L'œdème cytotoxique cause déjà des dommages tissulaires précoces car le gonflement des cellules désorganise leur cytosquelette et provoque leur mort par nécrose. Cependant, à ce stade, le volume global du cerveau n'augmente pas car cet œdème résulte d'une redistribution de l'eau et des ions de l'espace extracellulaire vers l'espace intracellulaire cérébral sans nouvel apport d'eau. Cet appauvrissement de l'espace extracellulaire établit de nouveaux gradients osmotiques entre les compartiments intravasculaire et extravasculaire, qui représentent une force motrice pour le passage de solutés et d'eau à travers la BHE. Ce passage, menant à l'œdème ionique, ne sera possible que si la BHE devient plus

perméable à cause de l'apparition d'un œdème cytotoxique cette fois endothélial, découlant d'une dysfonction métabolique précoce de la BHE. Bien que l'endothélium soit suspecté d'être plus résistant aux conséquences immédiates de l'ischémie que le tissu neuroglial (Westergaard *et al.*, 1976; Cole *et al.*, 1991), il est possible que l'œdème cytotoxique endothélial apparaisse à peu près au même moment (minutes à heures) que l'œdème cytotoxique neuroglial, selon la sévérité de l'occlusion. Ensuite, la reperfusion et la réaction inflammatoire provoquent une altération plus prononcée de la BHE, associée à une perturbation structurale importante de l'endothélium, souvent liée à la séparation des jonctions serrées interendothéliales, et laissant passer massivement de l'eau et des protéines plasmatiques pour constituer l'œdème dit vasogénique. Si les cellules endothéliales meurent ou si toute autre dégradation physique du capillaire intervient, du sérum et des hématies entrent dans le parenchyme et réalisent la transformation hémorragique.

Ainsi, l'intervention de la BHE dans la mise en place de l'œdème cérébral pourrait donc être beaucoup plus précoce que suggéré initialement. Elle résulterait d'une dysfonction endothéliale d'abord métabolique, puis physique, avec des degrés variables de sévérité et un lien direct avec les premiers dommages neurogliaux. La régulation fine et progressive de la perméabilité endothéliale serait la conséquence de mécanismes encore débattus, médiés par de nombreuses molécules issues des différentes cellules de l'UNV.

En effet, les mécanismes proposés impliquent plusieurs transporteurs dans la toute première phase du dysfonctionnement de la BHE. L'endothélium de la BHE accumulerait du sodium grâce à l'activité du cotransporteur Na^+ - K^+ - Cl^- présent sur sa membrane luminale (Brillault *et al.*, 2008). Ensuite, après gonflement cellulaire (œdème cytotoxique endothélial) par entrée d'eau *via* des aquaporines ou des aquaglycéroporines encore non identifiées, l'endothélium l'évacuerait vers le parenchyme (œdème ionique parenchymateux) par la Na^+ - K^+ -ATPase de sa membrane abluminale (Huang *et al.*, 1999). L'eau en excès pourrait également passer dans le cytoplasme astrocytaire *via* l'aquaporine-4, elle, clairement identifiée au niveau des pieds astrocytaires recouvrant la BHE. D'autres travaux suggèrent que la lame basale lésée capterait les ions et l'eau, et amorcerait le décollement tardif des pieds astrocytaires qui marquera à terme une dégradation physique de la BHE. D'autres études proposent une exacerbation de la pinocytose puis de la transcytose lors de cette phase précoce, bien qu'elle puisse se situer également dans la seconde phase du dysfonctionnement de la BHE, c'est-à-dire au début de l'œdème vasogénique, avant que les jonctions serrées

ne se rompent. À ce propos, comme ces jonctions spécialisées sont connues pour constituer un système dynamique, certains travaux suggèrent une régulation fine, qualifiée « d'ouverture » des jonctions serrées, qui interviendrait avant leur « rupture » menant à l'œdème vasogénique.

De nombreux modulateurs potentiels de la perméabilité endothéliale ont été mis en évidence : le glutamate qui semble augmenter la perméabilité *in vitro* (Andras *et al.*, 2007) et *in vivo* via le NO (Mayhan & Didion, 1996), le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) connu pour ses effets perméabilisants dans les phases précoces de l'ischémie, l'endothéline-1 dont l'action délétère sur la perméabilité de la BHE observée *in vivo* reste à expliquer, les espèces réactives de l'oxygène produites en grande quantité lors du stress oxydant, les cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL1 β , ...), et les gélatinases A et B connues sous le nom de métalloprotéases de la matrice extra-cellulaire (MMP-2 et 9 respectivement) qui dégraderaient la lame basale capillaire et provoqueraient la rupture tardive de la BHE. Cependant l'expression précoce de ces MMPs suggère une action plus subtile qu'une dégradation franche et ponctuelle, aux conséquences multiples sur la dysfonction de la BHE (Candelario-Jalil *et al.*, 2009). La MMP-9 semblerait pouvoir interagir directement avec les protéines de jonctions serrées comme l'occludine. Ces enzymes seraient produites par les cellules endothéliales, les péricytes, les astrocytes, les cellules microgliales, ainsi que par les polynucléaires neutrophiles lors de la réaction inflammatoire (Rosell *et al.*, 2008; Gautier *et al.*, 2009), suggérant l'idée d'une action complexe, élargie à l'ensemble du processus ischémique.

Lors de l'ischémie, l'endothélium de la BHE est donc ciblé par de nombreux médiateurs provenant des tissus environnants, et il subit des dommages progressifs et très variables selon le degré et le temps d'occlusion, et aussi selon l'efficacité de la reperfusion. En effet, celle-ci est parfois affectée par une période d'hypoperfusion appelée « *no-reflow* » dont les causes (thrombi secondaires, perte de fonction vasculaire...) et les conséquences sur la dysfonction endothéliale sont encore obscures malgré la découverte récente d'un rôle peut-être important de la contraction prolongée des péricytes, induite par le stress oxydant (Yemisci *et al.*, 2009). Cette période semble être située au moment de l'apparition de l'œdème ionique et précéderait l'œdème vasogénique aux conséquences dramatiques pour le patient. Le lien causal et temporel excessivement complexe, qui semble unir les réponses neurogliales et vasculaires à ces multiples stress, a fait évoluer le concept de BHE vers l'UNV et par là même a replacé la BHE au centre de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale.

Importance thérapeutique de la BHE pour l'ischémie cérébrale

Un obstacle à la thrombolyse

En amont de la mort neuronale, de l'œdème et des dommages de la reperfusion, rappelons que l'ischémie cérébrale est avant tout caractérisée par l'interruption ou la réduction importante du flux sanguin dans un territoire vasculaire précis, le plus souvent en conséquence de l'occlusion d'une artère cérébrale par un thrombus. Or l'objectif du traitement de l'AVC en phase aiguë est de limiter sa sévérité en limitant le temps de l'ischémie. Ce traitement consiste donc à lyser efficacement le caillot sanguin pour rétablir la circulation sanguine cérébrale dans les meilleurs délais.

Alors qu'en situation saine la fonction de barrière de la BHE est un problème pour la plupart des agents neuropharmacologiques, sa dysfonction après ischémie devient un problème pour les agents thrombolytiques. Parmi ces derniers, l'altéplase ou rtPA (activateur tissulaire recombinant du plasminogène) est la seule molécule indiquée pour la fibrinolyse en phase aiguë de l'infarctus cérébral (NINDS, 1995). Identique au tPA humain endogène, le rtPA va amplifier le processus physiologique de fibrinolyse. Cette protéase cible le plasminogène lié à la fibrine, et le convertit en plasmine, laquelle va découper la fibrine qui enserre le caillot et ainsi désagréger ce dernier. À une dose de 0,9 mg/kg administrée par perfusion intraveineuse en une heure, le rtPA apporte un bénéfice réel en termes de survie et de handicap fonctionnel (NINDS, 1995). Mais pour que le ratio bénéfice/risque demeure en faveur du traitement, le rtPA doit être administré dans une période, initialement de 3 h après l'apparition des symptômes, récemment étendue à 4h30 après une évaluation de l'efficacité et de la sécurité de son utilisation (Hacke *et al.*, 2008; Saver *et al.*, 2009). De ce fait, et compte tenu de l'organisation des soins, la thrombolyse au rtPA ne concerne qu'environ 5 % des patients admis. En effet, au risque d'extension des lésions s'ajoute un risque hémorragique (NINDS, 1997). À forte dose, l'affinité du rtPA pour la fibrine du caillot semble atteindre une limite, et le plasminogène activé n'est plus seulement celui du caillot mais le plasminogène circulant. Ceci conduit à une fibrinolyse et une fibrinogénolyse généralisées, suspectées d'être à l'origine des hémorragies. Mais cette complication ne peut s'expliquer uniquement par l'affinité du rtPA pour la fibrine. En effet, la plus grande fibrino-spécificité de la ténecteplase et de la rétépase, deux dérivés recombinants du rtPA testés dans la prise en charge de l'AVC, n'a conduit à aucune différence significative en terme d'hémorragies cérébrales (Chapman *et al.*, 2001; Lapchak *et al.*, 2004). De plus, la faible incidence des hémorragies cérébrales après administration

de rtPA pour le traitement de l'infarctus du myocarde (Gurwitz *et al.*, 1998) a suggéré un lien direct entre ces complications hémorragiques et le processus ischémique lui-même. Il a en effet été démontré que 80 % des saignements cérébraux après thrombolyse cérébrale se produisent préférentiellement dans le territoire ischémié (NINDS, 1997).

De ce fait, des effets neurotoxiques du rtPA ont été recherchés, sur la base des connaissances concernant le tPA endogène, dont la présence, connue dans le sang, a aussi été repérée au niveau des vaisseaux, et dans le parenchyme cérébral (Nicole *et al.*, 2001; Siao *et al.*, 2003). Dans ce dernier, l'action du tPA, multiple, a été associée à la plasticité synaptique, mais aussi à la mort cellulaire (Benchenane *et al.*, 2004; Samson & Medcalf, 2006; Yepes *et al.*, 2009).

Le tPA interagit avec le récepteur au NMDA (N-méthyl-D-aspartate), le récepteur LRP (*Low-density lipoprotein-receptor-related protein*) ou l'annexine-II et active diverses voies dans les cellules du parenchyme (Nicole *et al.*, 2001; Siao *et al.*, 2003; Yepes *et al.*, 2003). Dans le processus ischémique, le tPA a été associé au phénomène précoce d'excitotoxicité, sur la base de son action modulatrice positive de la neurotransmission glutamatergique dépendante du récepteur au NMDA dans des conditions physiologiques. Les neurones synthétisent du tPA, qui est ensuite stocké dans des vésicules pré-synaptiques puis relargué à la suite d'une dépolarisation. Dans l'espace synaptique, le tPA peut soit être récupéré par les astrocytes *via* leur récepteur membranaire LRP, soit se fixer et cliver l'extrémité N-terminale de la sous-unité NR1 du récepteur au NMDA. Ce clivage mène à une amplification de l'influx de calcium dans les neurones, qui peut devenir toxique lors de l'ischémie (excitotoxicité) et d'autant plus si c'est en présence de rtPA issu de la thrombolyse (Nicole *et al.*, 2001; Fernandez-Monreal *et al.*, 2004a, 2004b).

La présence de rtPA dans le parenchyme est expliquée par son passage par une BHE ouverte mais aussi à travers une BHE intacte (Benchenane *et al.*, 2005a, 2005b). Plusieurs raisons ont été proposées. La plus simple est que le passage de rtPA vers le parenchyme peut se réaliser à travers une BHE déjà ouverte par le processus ischémique. Bien que ceci ne concorde pas avec la thrombolyse pratiquée en clinique, cette hypothèse ne peut être écartée, compte tenu de la complexité de la cinétique d'ouverture de cette barrière, dont les phases précoces sont plus difficiles à observer autant en imagerie clinique que dans les modèles expérimentaux. L'interprétation des travaux sur les effets vasculaires du tPA est de ce fait subordonnée aux variations de perméabilité de la BHE dans les différents modèles.

Selon une seconde hypothèse, le tPA pourrait traverser la BHE en dégradant l'endothélium par sa

propre activité protéolytique, mais une étude a montré que celle-ci n'était pas requise (Benchenane *et al.*, 2005a). Ainsi, cette preuve de la possibilité de passage du rtPA à dose thrombolytique à travers une BHE intacte suggère que cette protéase pourrait interagir avec l'endothélium de la BHE avant sa rupture par le processus ischémique et y contribuer dans le cadre particulier de la thrombolyse où les hémorragies sont favorisées. Ainsi le tPA provoquerait la rupture de la BHE (Kidwell *et al.*, 2008) en stimulant la synthèse et/ou l'activité de la MMP-9 (Aoki *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Kelly *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007), ce qui exacerberait la dégradation de la lame basale et provoquerait à terme une hémorragie, laquelle serait aggravée par les produits de la thrombolyse (Gautier *et al.*, 2003).

Enfin selon une autre piste, le rtPA activerait le facteur nucléaire NF- κ B dans les astrocytes et induirait ainsi l'expression de l'enzyme inductible de synthèse du NO (*inducible nitric oxide synthase* : iNOS), ce qui provoquerait une augmentation de la perméabilité de la BHE (Zhang *et al.*, 2007). Du passage transendothélial du rtPA à l'activation astrocytaire de MMP-9, le récepteur LRP se distingue comme un dénominateur commun (Lapchak *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Yepes *et al.*, 2003). Une synthèse de ces mécanismes a récemment été tentée, avec la perspective d'établir un lien de cause à effet entre eux (Yepes *et al.*, 2009).

Lors de l'étape précoce de l'ischémie, l'activité du tPA (plus du rtPA apporté par la thrombolyse) augmenterait dans l'espace occupé par la lame basale et les péricytes par suite de son passage à travers la BHE. Ce tPA interagirait avec le récepteur LRP astrocytaire, ce qui provoquerait la perte du domaine extracellulaire du LRP (Polavarapu *et al.*, 2007, 2008) au sein de la lame basale. Ceci libérerait le domaine intracellulaire du LRP dans le cytoplasme astrocytaire induisant ainsi l'activation de NF- κ B et l'expression de la iNOS et de la MMP-9 au sein de l'UNV, ce qui provoquerait un détachement des pieds astrocytaires de la lame basale, phénomène connu, supposé tardif dans la cinétique d'ouverture de la BHE. Cependant, il est tentant de spéculer que le mécanisme décrit ici serait une accélération du processus pathologique consécutif à l'utilisation du rtPA, et impliquerait les cellules périvasculaires de l'UNV.

Pour résumer, la BHE est un obstacle à la thrombolyse dans le sens où elle semble ne pas être une barrière pour le rtPA, qui peut ainsi exercer des effets neurotoxiques. Ceux-ci s'accompagneraient d'une action sur les astrocytes et peut-être sur les autres cellules gliales, qui provoquerait ou accélérerait la rupture secondaire de la BHE et favoriserait la survenue d'hémorragies. Ainsi, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont évoquées, qui empêcheraient le

rtPA à la fois de passer la BHE et d'interagir avec le récepteur au NMDA au sein de l'UNV (Yepes *et al.*, 2009). Pour cela, des mutations dans les domaines fonctionnels appropriés du rtPA sont tentées. Par ailleurs, la desmotéplase ou DSPA, un thrombolytique issu de la salive de la chauve-souris *Desmodus rotundus*, a été développé, qui semblait prometteur puisqu'il ne montre que peu d'effets neurotoxiques, et interagit avec l'endothélium *via* le même récepteur LRP que le tPA (Liberatore *et al.*, 2003; Lopez-Atalaya *et al.*, 2007). Malheureusement, le résultat de l'étude clinique en phase III (DIAS-2, *Desmoteplase In Acute ischemic Stroke*) n'a montré aucun bénéfice par rapport au placebo (Hacke *et al.*, 2009). Cependant, l'utilisation d'un dérivé du DSPA pourrait empêcher la liaison du tPA au récepteur LRP endothélial, son passage à travers la BHE et la rupture brutale de celle-ci en neutralisant les LRP astrocytaires. Toutefois, une étude récente démontre que le tPA peut rompre la BHE en activant l'isoforme CC du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) au niveau de l'UNV qui alors active son récepteur PDGFR- α astrocytaire; ceci suggère une autre stratégie qui implique également les cellules périvasculaires de l'UNV (Su *et al.*, 2008). Ces nouvelles stratégies apportent une alternative à l'inhibition des MMPs dont il est difficile de prévoir les effets délétères possibles *via* des conséquences négatives sur le phénomène de remodelage vasculaire. Ce risque est d'autant plus grand qu'il a été démontré que même le caractère prédictif des MMPs et d'autres marqueurs plasmatiques vis-à-vis des hémorragies peut être biaisé par la variabilité génétique des individus, ce qui pourrait influencer la réponse de chacun au traitement thrombolytique par le rtPA (Montaner, 2006). En imagerie clinique, seule une colocalisation des zones de modification précoce des séquences IRM (imagerie par résonance magnétique) de diffusion (mouvements d'eau représentant l'infarct constitué) et de perfusion (zone d'hypoperfusion due à l'occlusion) exclut le patient de la thrombolyse, car à ce stade, la thrombolyse a de grandes chances de provoquer une hémorragie. S'il n'y a pas localisation, le patient peut être thrombolysé, mais plus rien ne peut aider le médecin à évaluer ce risque, car la dysfonction de la BHE est alors invisible. Malgré des efforts fournis pour mieux comprendre la relation entre la BHE et le risque hémorragique (Kidwell *et al.*, 2008), seule une meilleure définition de la cinétique de la dysfonction de l'UNV permettra d'affiner l'éligibilité des patients pour la thrombolyse, et à terme, d'accroître leur nombre.

L'échec de la neuroprotection

Le temps est un paramètre important dans l'évolution de la taille 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 milliards de synapses et 714 km de fibres myélinisées 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 pour chaque heure où les symptômes ne sont pas traités. Les stratégies thérapeutiques développées reposent essentiellement sur le concept de pénombre ischémique et ont pour but de sauver les neurones ischémisés mais encore viables localisés dans cette zone. Compte tenu du faible nombre de patients éligibles pour la thrombolyse, de nombreux composés pharmaceutiques sont développés dans le but de limiter la progression de la lésion cérébrale, en ciblant les différents mécanismes menant à la mort neuronale (Green, 2008). La plupart de ces composés sont des antagonistes des récepteurs au NMDA, qui agissent sur le phénomène d'excitotoxicité, ou des bloqueurs des canaux ioniques, ou encore des piègeurs de radicaux libres s'attaquant au stress oxydant, ou enfin des anti-inflammatoires et des anti-apoptotiques. Cependant, malgré des effets protecteurs observés dans les études précliniques, aucune molécule n'a encore démontré une protection efficace en clinique contre la mort neuronale en phase aiguë de l'ischémie (Ducruet *et al.*, 2009). La plupart des recherches menées sur les maladies cérébrales se focalisent encore sur les dommages neuronaux, car d'une manière générale la mort des neurones est la cause majeure des déficits cognitifs causés par les maladies neurologiques. Cependant, 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 ischémiques ne recouvrent pas une seule mais un ensemble de pathologies caractérisées par l'apparition brutale de déficiences liées à des lésions cérébrales d'origine vasculaire. De plus, leur complexité tient autant à la variété des lésions cérébrales observées qu'aux mécanismes physiopathologiques. Ainsi, le traitement de l'ischémie cérébrale est limité à la restitution du flux sanguin pour 5 % des patients, accompagnée d'une modulation de la cascade de coagulation pendant la phase aiguë par administration d'aspirine (Donnan *et al.*, 2008). L'échec du développement de nombreuses molécules à visée neuroprotectrice en phase aiguë, durant ces vingt dernières années, a orienté les stratégies vers la neuroprotection préventive, et a même fait émerger le concept thérapeutique de tolérance à l'ischémie (Dirnagl *et al.*, 2009). L'objectif est d'induire des mécanismes défensifs contre les conséquences de l'ischémie avant que celle-ci ne survienne. Cette résistance à l'ischémie peut être induite

expérimentalement par de nombreux stimuli différents (Chen & Simon, 1997), dont le préconditionnement ischémique. Ce procédé est apparu en 1985 grâce à des travaux sur l'infarctus du myocarde, montrant que des occlusions coronariennes brèves, incapables de provoquer une nécrose myocytaire mais réalisées avant une occlusion prolongée, pouvaient réduire de façon importante (50 % à 75 %) le volume de l'infarctus final. Cette première et légère agression ischémique déclencherait des mécanismes endogènes qui rendraient l'organe plus résistant à l'agression suivante, à la manière d'une adaptation au stress (Murry *et al.*, 1986). Deux périodes de tolérance peuvent être induites par le préconditionnement. La première 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 24 h, 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. La nature diverse des molécules inductrices de préconditionnement suggère que les mécanismes mis en jeu convergeraient vers des voies de signalisation menant à un phénotype de tolérance (Kirino, 2002).

Ces mécanismes sont complexes, car ils impliquent à la fois la diminution des phénomènes délétères mais aussi l'induction de mécanismes de résistance et de réparation. L'induction de la tolérance à l'ischémie dépendrait de la coordination de réponses au niveau génomique, moléculaire, cellulaire et tissulaire (Stenzel-Poore *et al.*, 2003, 2004). De nombreuses études *in vivo*, et aussi *in vitro* sur des cultures de neurones ou des coupes de cerveau ont été menées dans ce sens (Cadet & Krasnova, 2009). Mais la récente prise en considération des phénomènes neurovasculaires dans le processus physiopathologique de l'ischémie cérébrale a fait croître l'intérêt pour les approches vasculaires. Des effets protecteurs du préconditionnement à ce niveau ont été observés *in vivo*, et démontrent que la fonction endothéliale est préservée par l'amélioration du flux sanguin cérébral lors de la reperfusion dans les zones périphériques à la lésion (Kunz *et al.*, 2007), et que l'intégrité de la BHE est maintenue par une diminution de la formation de l'œdème (Masada *et al.*, 2001). La protection induite a été à nouveau corrélée à une diminution de l'expression de la MMP-9 (Zhang *et al.*, 2006), mais aussi à une adhésion réduite des neutrophiles aux cellules endothéliales *via* une diminution de l'expression d'ICAM-1 (Zahler *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2003). Ces résultats ont été confirmés par des études *in vitro* qui rapportent un effet protecteur *via* la préservation

de l'intégrité de la BHE par la diminution de l'expression des molécules de l'inflammation ICAM-1 et VCAM-1 (Andjelkovic *et al.*, 2003; An & Xue, 2009) mais également par le maintien de la structure des jonctions serrées (An & Xue, 2009).

La neuroprotection préventive concerne également la prise en charge des facteurs de risque, et dans ce contexte, des études démontrent que l'activité physique (Deplanque & Bordet, 2009) 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). Dans ce contexte, les agents pharmacologiques impliqués sont des activateurs des récepteurs nucléaires PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*). Présents sous trois isoformes α , β/δ ou γ , ces récepteurs ont une activité pléiotrope dans le sens où ils peuvent activer ou réprimer la transcription de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique, mais aussi dans l'inflammation. Leur localisation est concentrée dans les tissus et les cellules liés à cette fonction (Desvergne & Wahli, 1999; Lefebvre *et al.*, 2006). Ces récepteurs s'expriment également dans le SNC, au niveau des neurones, des cellules endothéliales ainsi que dans les cellules gliales (Moreno *et al.*, 2004). Lorsque ces récepteurs sont activés par un ligand, leur mécanisme d'action peut être lent (heures, jours) et correspond à une activation de la transcription ou transactivation; c'est le cas des gènes du métabolisme lipidique et glucidique. Mais il peut être rapide (minutes, heures) et correspond à une inhibition de la transcription ou transrépression (Ricote & Glass, 2007). Ce dernier mécanisme ne nécessite pas de liaison sur l'ADN mais une interaction de type protéine-protéine avec d'autres facteurs de transcription comme le NF- κ B de STAT-3 et AP-1 qui inhibe leur activité; c'est le cas de gènes de l'inflammation (Delerive *et al.*, 1999).

Indépendamment de son activité hypolipémiante, le PPAR- α s'est révélé neuroprotecteur lors de nombreuses études *in vivo* chez la souris soumise à une ischémie transitoire et à des traitements préventifs ou curatifs par des agonistes 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). La protection observée serait le résultat d'un mécanisme anti-inflammatoire qui diminuerait l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 au niveau des cellules endothéliales cérébrales. Des effets antioxydants ont été également observés. Des effets protecteurs de PPAR- γ s'exerceraient par des mécanismes comparables (Luo *et al.*, 2006) mais aussi *via* l'inhibition de la voie du NF- κ B et du TNF- α (Pantoni *et al.*, 1998; Mabuchi *et al.*, 2000) et celle de l'activation des macrophages et des cellules microgliales,

prévenant ainsi la production de cytokines (Kielian & Drew, 2003). Une étude suggère également que les agonistes PPAR- γ pourraient inhiber la mort neuronale induite par l'excitotoxicité (Zhao *et al.*, 2006). Les statines sont des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, une enzyme qui catalyse la conversion de l'HMG-CoA (3-hydroxy 3-méthylglutaryl coenzyme A) en mévalonate, un précurseur du cholestérol. Les statines sont donc des hypolipémiants, mais elles présentent également des effets pléiotropes s'exerçant au niveau vasculaire (Endres, 2005). Outre une action protectrice contre l'excitotoxicité de neurones en culture (Zacco *et al.*, 2003), les statines ont démontré un effet protecteur sur les cellules endothéliales en maintenant l'intégrité de la BHE dans un contexte d'excitotoxicité au glutamate *in vitro* (Kuhlmann *et al.*, 2008) et aussi en inhibant la synthèse de MMP-9 dans les astrocytes activés par le rtPA (Wang *et al.*, 2006). Bien qu'aujourd'hui aucune étude n'ait démontré de lien physiopathologique entre le cholestérol et l'ischémie cérébrale (Amarenco *et al.*, 2009), les statines pourraient agir *via* les récepteurs nucléaires PPARs, et notamment par une augmentation de l'expression et de l'activité de PPAR- α (Martin *et al.*, 2001; Jasinska *et al.*, 2007; Paumelle & Staels, 2008).

En résumé, l'ensemble des données de la littérature suggère finalement qu'une explication possible à l'échec des neuroprotecteurs viendrait du fait que chaque composé développé ne ciblait qu'un seul mécanisme du processus physiopathologique de l'ischémie cérébrale. Le préconditionnement ischémique apparaît comme une stratégie expérimentale attractive qui permettrait d'identifier des mécanismes endogènes de protection. Ceux-ci pourraient être induits pharmacologiquement dans un cadre thérapeutique fondé sur l'induction de cette tolérance dans le but d'anticiper la survenue d'une ischémie chez des individus à haut risque de faire un AVC. Cependant, l'amélioration de la thérapie en phase aiguë demeure une priorité en raison de l'incidence toujours élevée des AVC et du faible taux de patients thrombolysés, où la « neuroprotection » élargie à l'UNV serait associée à la reperfusion (Fisher, 2011). Et bien que certains mécanismes inflammatoires et oxydants se retrouvent à l'issue des diverses stimulations expérimentales, de nombreux autres pourraient participer à l'apparition et à la progression des lésions cérébrovasculaires. Les molécules à activité pléiotrope offrent une alternative thérapeutique prometteuse (Bordet *et al.*, 2006) mais qui demande une connaissance approfondie de l'UNV pour être validée. Et pour atteindre cet objectif, le besoin se fait sentir de recherches transversales qui combinerait les approches *in vivo* et *in vitro* (Mehra *et al.*, 2011).

Références

- Abbott N.J., Ronnback L., Hansson E., Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev*, 2006, 7, 41–53.
- Aller S.G., Yu J., Ward A., Weng Y., Chittaboina S., Zhuo R., Harrell P.M., Trinh Y.T., Zhang Q., Urbatsch I.L., Chang G., Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, 2009, 323, 1718–1722.
- Amarenco P., Hypercholesterolemia, lipid-lowering agents, and the risk for brain infarction. *Neurology*, 2001, 57, S35–S44.
- Amarenco P., Benavente O., Goldstein L.B., Callahan A. 3rd, Silleesen H., Hennerici M.G., Gilbert S., Rudolph A.E., Simunovic L., Zivin J.A., Welch K.M., Results of the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) trial by stroke subtypes. *Stroke*, 2009, 40, 1405–1409.
- An P., Xue Y.X., Effects of preconditioning on tight junction and cell adhesion of cerebral endothelial cells. *Brain Res*, 2009, 1272, 81–88.
- Andjelkovic A.V., Stamatovic S.M., Keep R.F., The protective effects of preconditioning on cerebral endothelial cells *in vitro*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23, 1348–1355.
- Andras I.E., Deli M.A., Veszelka S., Hayashi K., Hennig B., Toborek M., 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*, 2007, 27, 1431–1443.
- Aoki T., Sumii T., Mori T., Wang X., Lo E.H., Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury: mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, 2002, 33, 2711–2717.
- Ayata C., Ropper A.H., Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci*, 2002, 9, 113–124.
- Ballabh P., Braun A., Nedergaard M., The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*, 2004, 16, 1–13.
- Begley D.J., ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des*, 2004, 10, 1295–1312.
- Begley D.J., Brightman M.W., Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res*, 2003, 61, 39–78.
- Benchenane K., Lopez-Atalaya J.P., Fernandez-Monreal M., Touzani O., Vivien D., Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in stroke-induced injury. *Trends Neurosci*, 2004, 27, 155–160.
- Benchenane K., Bérézowski 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., Vivien D., Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation*, 2005a, 111, 2241–2249.

- Benchenane K., Bérézowski V., Fernandez-Monreal M., Brillault J., Valable S., Dehouck M.P., Cecchelli R., Vivien D., Touzani O., Ali C., Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain barrier from an LRP-dependent to an increased LRP-independent process. *Stroke*, 2005b, 36, 1065–1070.
- Bérézowski V., Landry C., Dehouck M.P., Cecchelli R., Fénart L., 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*, 2004, 1018, 1–9.
- Bloomfield Rubins H., Davenport J., Babikian V., Brass L.M., Collins D., Wexler L., Wagner S., Papademetriou V., Rutan G., Robins S.J., Reduction in stroke with gemfibrozil in men with coronary heart disease and low HDL cholesterol: The Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Circulation*, 2001, 103, 2828–2833.
- Bordet R., Gelé P., Duriez P., Fruchart J.C., PPARs: a new target for neuroprotection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2006, 77, 285–287.
- Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J., A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92, 1295–1302.
- Bradbury M.W., Physiopathology of the blood-brain barrier. *Adv Exp Med Biol*, 1976, 69, 507–516.
- Brightman M.W., Reese T.S., Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*, 1969, 40, 648–677.
- Brillault J., Bérézowski V., Cecchelli R., Dehouck M.P., Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J Neurochem*, 2002, 83, 807–817.
- Brillault J., Lam T.I., Rutkowsky J.M., Foroutan S., O'Donnell M.E., Hypoxia effects on cell volume and ion uptake of cerebral microvascular endothelial cells. *Am J Physiol*, 2008, 294, C88–C96.
- Cadet J.L., Krasnova I.N., Cellular and molecular neurobiology of brain preconditioning. *Mol Neurobiol*, 2009, 39, 50–61.
- Candelario-Jalil E., Yang Y., Rosenberg G.A., Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*, 2009, 158, 983–994.
- Cecchelli R., Bérézowski V., Lundquist S., Culot M., Renftel M., Dehouck M.P., Fénart L., Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev*, 2007, 6, 650–661.
- Chapman D.F., Lyden P., Lapchak P.A., Nunez S., Thibodeaux H., Zivin J., Comparison of TNK with wild-type tissue plasminogen activator in a rabbit embolic stroke model. *Stroke*, 2001, 32, 748–752.
- Chen J., Simon R., Ischemic tolerance in the brain. *Neurology*, 1997, 48, 306–311.
- Cole D.J., Matsumura J.S., Drummond J.C., Schultz R.L., Wong M.H., Time- and pressure-dependent changes in blood-brain barrier permeability after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Neuropathol*, 1991, 82, 266–273.
- Collino M., Aragno M., Mastrocola R., Benetti E., Gallicchio M., Dianzani C., Danni O., Thiemermann C., Fantozzi R., Oxidative stress and inflammatory response evoked by transient cerebral ischemia/reperfusion: effects of the PPAR-alpha agonist WY14643. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41, 579–589.
- Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Casals D., Rittman-Grauer L., Biedler J.L., Melamed M.R., Bertino J.R., Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86, 695–698.
- Crone C., The blood-brain-barrier. Facts and questions. In Siesjo B.K., Sorensen S.C. (Eds.) *Ion homeostasis of the brain*, 1971, Munksgaard, Copenhagen, pp. 52–62.
- Dallas S., Miller D.S., Bendayan R., Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev*, 2006, 58, 140–161.
- DeBault L.E., Cancilla P.A., Gamma-glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science*, 1980, 207, 653–655.
- Dehouck B., Dehouck M.P., Fruchart J.C., Cecchelli R., Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol*, 1994, 126, 465–473.
- Delerive P., De Bosscher K., Besnard S., Vanden Berghe W., Peters J.M., Gonzalez F.J., Fruchart J.C., Tedgui A., Haegeman G., Staels B., 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*, 1999, 274, 32048–32054.
- Deplanque D., Gelé P., Pétrault O., Six I., Furman C., Bouly M., Nion S., Dupuis B., Leys D., Fruchart J.C., Cecchelli R., Staels B., Duriez P., Bordet R., Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. *J Neurosci*, 2003, 23, 6264–6271.
- Deplanque D., Masse I., Lefebvre C., Libersa C., Leys D., Bordet R., Prior TIA, lipid-lowering drug use, and physical activity decrease ischemic stroke severity. *Neurology*, 2006, 67, 1403–1410.
- Deplanque D., Bordet R., Physical activity: one of the easiest ways to protect the brain? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2009, 80, 942.
- Desvergne B., Wahli W., Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, 1999, 20, 649–688.
- Dirnagl U., Becker K., Meisel A., Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental

- strategies to clinical use. *Lancet Neurol*, 2009, 8, 398–412.
- Donnan G.A., Fisher M., Macleod M., Davis S.M., Stroke. *Lancet*, 2008, 371, 1612–1623.
- Ducruet A.F., Grobelny B.T., Zacharia B.E., Hickman Z.L., Yeh M.L., Connolly E.S., Pharmacotherapy of cerebral ischemia. *Expert Opin Pharmacother*, 2009, 10, 1895–1906.
- Eisenblatter T., Huwel S., Galla H.J., Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res*, 2003, 971, 221–231.
- el-Bacha R.S., Minn A., Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell Mol Biol*, 1999, 45, 15–23.
- Endres M., Statins and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25, 1093–1110.
- Endres M., Engelhardt B., Koistinaho J., Lindvall O., Meairs S., Mohr J.P., Planas A., Rothwell N., Schwaninger M., Schwab M.E., Vivien D., Wieloch T., Dirnagl U., Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis*, 2008, 25, 268–278.
- Erlich P., Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Ein farbenanalytische Studie. 1885, A Hirschwald Edit, Berlin.
- Evers R., Zaman G.J., van Deemter L., Jansen H., Calafat J., Oomen L.C., Oude Elferink R.P., Borst P., Schinkel A.H., Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *J Clin Invest*, 1996, 97, 1211–1218.
- Fagan S.C., Hess D.C., Hohnadel E.J., Pollock D.M., Ergul A., Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke*, 2004, 35, 2220–2225.
- Fénart L., Buee-Scherrer V., Descamps L., Duhem C., Poullain M.G., Cecchelli R., Dehouck M.P., 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. *Pharmaceutical Res*, 1998, 15, 993–1000.
- Fernandez-Monreal M., Lopez-Atalaya J.P., Benchenane K., Cacquevel M., Dulin F., Le Caer J.P., Rossier J., Jarrige A.C., Mackenzie E.T., Colloc'h N., Ali C., Vivien D., Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J Biol Chem*, 2004a, 279, 50850–50856.
- Fernandez-Monreal M., Lopez-Atalaya J.P., Benchenane K., Leveille F., Cacquevel M., Plawinski L., MacKenzie E.T., Bu G., Buisson A., Vivien D., Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Mol Cell Neurosci*, 2004b, 25, 594–601.
- Fisher M., New approaches to neuroprotective drug development. *Stroke*, 2011, 42, S24–27.
- Gautier S., Pétrault O., Gele P., Laprais M., Bastide M., Bauters A., Deplanque D., Jude B., Caron J., Bordet R., Involvement of thrombolysis in recombinant tissue plasminogen activator-induced cerebral hemorrhages and effect on infarct volume and postischemic endothelial function. *Stroke*, 2003, 34, 2975–2979.
- Gautier S., Ouk T., Pétrault O., Caron J., Bordet R., Neutrophils contribute to intracerebral haemorrhages after treatment with recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol*, 2009, 156, 673–679.
- Gherzi-Egea J.F., Leninger-Muller B., Suleman G., Siest G., Minn A., Localization of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *J Neurochem*, 1994, 62, 1089–1096.
- Goldmann E., Vitalfärbung am zentral nerven System. Beitrag zur Physiologie des Plexus choroïdus und der Hirnhäute. 1913, Berlin.
- Green A.R., Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *Br J Pharmacol*, 2008, 153, S325–S338.
- Gurwitz J.H., Gore J.M., Goldberg R.J., Barron H.V., Breen T., Rundle A.C., Sloan M.A., French W., Rogers W.J., Risk for intracranial hemorrhage after tissue plasminogen activator treatment for acute myocardial infarction. Participants in the National Registry of Myocardial Infarction 2. *Ann Internal Med*, 1998, 129, 597–604.
- Hacke W., Furlan A.J., Al-Rawi Y., Davalos A., Fiebich J.B., Gruber F., Kaste M., Lipka L.J., Pedraza S., Ringleb P.A., Rowley H.A., Schneider D., Schwamm L.H., Leal J.S., Söhngen M., Teal P.A., Wilhelm-Ogunbiyi K., Wintermark M., Warach S., Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet neurol*, 2009, 8, 141–150.
- Hacke W., Kaste M., Bluhmki E., Brozman M., Davalos A., Guidetti D., Larrue V., Lees K.R., Medeghri Z., Machnig T., Schneider D., von Kummer R., Wahlgren N., Toni D., ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 h after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 2008, 359, 1317–1329.
- Haseloff R.F., Blasig I.E., Bauer H.C., Bauer H., In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol*, 2005, 25, 25–39.
- Hirano A., Kawanami T., Llana J.F., Electron microscopy of the blood-brain barrier in disease. *Microsc Res Tech*, 1994, 27, 543–556.
- Huang Z.G., Xue D., Preston E., Karbalai H., Buchan A.M., Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia: effects of hypothermia. *Can J Neurol Sci*, 1999, 26, 298–304.
- Huber J.D., Egleton R.D., Davis T.P., Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in

- the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*, 2001, 24, 719–725.
- Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev*, 2004, 5, 347–360.
- Inoue H., Jiang X.F., Katayama T., Osada S., Umesono K., Namura S., Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice. *Neurosci Lett*, 2003, 352, 203–206.
- Jasinska M., Owczarek J., Orszulak-Michalak D., Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep*, 2007, 59, 483–499.
- Jette L., Murphy G.F., Leclerc J.M., Beliveau R., Interaction of drugs with P-glycoprotein in brain capillaries. *Biochem Pharmacol*, 1995, 50, 1701–1709.
- Jones, E.G., On the mode of entry of blood vessels into the cerebral cortex. *J Anat*, 1970, 106, 507–520.
- Joo F., Increased production of coated vesicles in the brain capillaries during enhanced permeability of the blood-brain barrier. *Br J Exp Pathol*, 1971, 52, 646–649.
- Kahle K.T., Simard J.M., Staley K.J., Nahed B.V., Jones P.S., Sun D., Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda)*, 2009, 24, 257–265.
- Kelly M.A., Shuaib A., Todd K.G., Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Exp Neurol*, 2006, 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., Warach S., Thrombolytic toxicity: blood brain barrier disruption in human ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*, 2008, 25, 338–343.
- Kielian T., Drew P.D., Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation. *J Neurosci Res*, 2003, 71, 315–325.
- Kirino T., Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22, 1283–1296.
- Klatzo I., Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1967, 26, 1–14.
- Kruh G.D., Guo Y., Hopper-Borge E., Belinsky M.G., Chen Z.S., ABCC10, ABCC11, and ABCC12. *Pflugers Arch*, 2007, 453, 675–684.
- Kuhlmann C.R., Gerigk M., Bender B., Closhen D., Lessmann V., Luhmann H.J., Fluvastatin prevents glutamate-induced blood-brain-barrier disruption in vitro. *Life Sci*, 2008, 82, 1281–1287.
- Kunz A., Park L., Abe T., Gallo E.F., Anrather J., Zhou P., Iadecola C., Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *J Neurosci*, 2007, 27, 7083–7093.
- Kusuhara H., Sugiyama Y., Active efflux across the blood-brain barrier: role of the solute carrier family. *NeuroRx*, 2005, 2, 73–85.
- Lapchak P.A., Chapman D.F., Zivin J.A., Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke*, 2000, 31, 3034–3040.
- Lapchak P.A., Araujo D.M., Zivin J.A., Comparison of Tenecteplase with Alteplase on clinical rating scores following small clot embolic strokes in rabbits. *Exp Neurol*, 2004, 185, 154–159.
- Lee S.R., Guo S.Z., Scannevin R.H., Magliaro B.C., Rhodes K.J., Wang X., Lo E.H., Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neurosci Letters*, 2007, 417, 1–5.
- Lefebvre P., Chinetti G., Fruchart J.C., Staels B., Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest*, 2006, 116, 571–580.
- Lewandowsky M., Zur lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. *Z Klin Med*, 1900, 480–494.
- Liberatore G.T., Samson A., Bladin C., Schleuning W.D., Medcalf R.L., Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase): a unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. *Stroke*, 2003, 34, 537–543.
- Lopez-Atalaya J.P., Roussel B.D., Ali C., Maubert E., Petersen K.U., Bérézowski V., Cecchelli R., Orset C., Vivien D., Recombinant *Desmodus rotundus* salivary plasminogen activator crosses the blood-brain barrier through a low-density lipoprotein receptor-related protein-dependent mechanism without exerting neurotoxic effects. *Stroke*, 2007, 38, 1036–1043.
- Loscher W., Potschka H., Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx*, 2005, 2, 86–98.
- Luo Y., Yin W., Signore A.P., Zhang F., Hong Z., Wang S., Graham S.H., Chen J., Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *J Neurochem*, 2006, 97, 435–448.
- Mabuchi T., Kitagawa K., Ohtsuki T., Kuwabara K., Yagita Y., Yanagihara T., Hori M., Matsumoto M., Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2000, 31, 1735–1743.
- Mandarino L.J., Sundarraj N., Finlayson J., Hassell H.R., Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes *in vitro*. *Exp Eye Res*, 1993, 57, 609–621.
- Martin G., Duez H., Blanquart C., Bérézowski V., Poulain P., Fruchart J.C., Najib-Fruchart J., Glineur C., Staels B., Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest*, 2001, 107, 1423–1432.
- Masada T., Hua Y., Xi G., Ennis S.R., Keep R.F., Attenuation of ischemic brain edema and

- cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21, 22–33.
- Mayhan W.G., Didion S.P., Glutamate-induced disruption of the blood-brain barrier in rats. Role of nitric oxide. *Stroke*, 1996, 27, 965–969 ; discussion 970.
- Maynard E.A., Schultz R.L., Pease D.C., Electron microscopy of the vascular bed of rat cerebral cortex. *Am J Anat*, 1957, 100, 409–433.
- Mehra M., Henninger N., Hirsch J.A., Chueh J., Wakhloo A.K., Gounis M.J., Preclinical acute ischemic stroke modeling. *J Neurointerv Surg*, 2011, pages
- Montaner J., Stroke biomarkers: Can they help us to guide stroke thrombolysis? *Drug News Perspect*, 2006, 19, 523–532.
- Moreno S., Farioli-Vecchioli S., Ceru M.P., Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, 2004, 123, 131–145.
- Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A., Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, 74, 1124–1136.
- Nag S., Pathophysiology of blood-brain barrier breakdown. *Methods Mol Med*, 2003, 89, 97–119.
- Newman E.A., New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci*, 2003, 26, 536–542.
- Nicole O., Docagne F., Ali C., Margail I., Carmeliet P., MacKenzie E.T., Vivien D., Buisson A., The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med*, 2001, 7, 59–64.
- NINDS., Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med*, 1995, 333, 1581–1587.
- NINDS., Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke*, 1997, 28, 2109–2118.
- Pantoni L., Sarti C., Inzitari D., Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18, 503–513.
- Pardridge W.M., Advances in cell biology of blood-brain barrier transport. *Semin Cell Biol*, 1991, 2, 419–426.
- Pardridge W.M., Recent developments in peptide drug delivery to the brain. *Pharmacol Toxicol*, 1992, 71, 3–10.
- Paumelle R., Staels B., Cross-talk between statins and PPARalpha in cardiovascular diseases: clinical evidence and basic mechanisms. *Trends Cardiovasc Med*, 2008, 18, 73–78.
- Payen J.F., Fauvage B., Falcon D., Lavagne P., Brain oedema following blood-brain barrier disruption: mechanisms and diagnosis. *Ann Fr Anesth Reanim*, 2003, 22, 220–225.
- Pellerin L., Magistretti P.J., Food for thought: challenging the dogmas. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23, 1282–1286.
- Polavarapu R., Gongora M.C., Yi H., Ranganathan S., Lawrence D.A., Strickland D., Yepes M., Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood*, 2007, 109, 3270–3278.
- Polavarapu R., An J., Zhang C., Yepes M., Regulated intramembrane proteolysis of the low-density lipoprotein receptor-related protein mediates ischemic cell death. *Am J Pathol*, 2008, 172, 1355–1362.
- Povlishock J.T., Becker D.P., Sullivan H.G., Miller J.D., Vascular permeability alterations to horseradish peroxidase in experimental brain injury. *Brain Res*, 1978, 153, 223–239.
- Reese T.S., Karnovsky M.J., Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*, 1967, 34, 207–217.
- Ricote M., Glass C.K., PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1771, 926–935.
- Rosell A., Cuadrado E., Ortega-Aznar A., Hernandez-Guillamon M., Lo E.H., Montaner J., MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke*, 2008, 39, 1121–1126.
- Samson A.L., Medcalf R.L., Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron*, 2006, 50, 673–678.
- Sandoval K.E., Witt K.A., Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis*, 2008, 32, 200–219.
- Saver J.L., Time is brain-quantified. *Stroke*, 2006, 37, 263–266.
- Saver J.L., Gornbein J., Grotta J., Liebeskind D., Lutsep H., Schwamm L., Scott P., Starkman S., Number needed to treat to benefit and to harm for intravenous tissue plasminogen activator therapy in the 3- to 4.5-h window: joint outcome table analysis of the ECASS 3 trial. *Stroke*, 2009, 40, 2433–2437.
- Scherrmann J.M., Expression and function of multidrug resistance transporters at the blood-brain barriers. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2005, 1, 233–246.
- Schinkel A.H., Jonker J.W., Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55, 3–29.
- Siao C.J., Fernandez S.R., Tsirka S.E., Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *J Neurosci*, 2003, 23, 3234–3242.
- Simard M., Arcuino G., Takano T., Liu Q.S., Nedergaard M., Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci*, 2003, 23, 9254–9262.
- Soontornmalai A., Vlaming M.L., Fritschy J.M., Differential, strain-specific cellular and subcellular distribution of multidrug transporters in murine

- choroid plexus and blood-brain barrier. *Neuroscience*, 2006, 138, 159–169.
- Spatz H., Die bedeutung der vitalen farbung für die lehre von stoffanstauch zwischen dem zentralnervensystem und dem übrigen körper. Das morphologische substart der stoffwechselschranken im zentralorgan. *Arch Psychiat Nervenkr*, 1933, 101, 267–358.
- Stenzel-Poore M.P., Stevens S.L., Simon R.P., Genomics of preconditioning. *Stroke*, 2004, 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., Simon R.P., Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet*, 2003, 362, 1028–1037.
- Stern L.S., Gautier R., Les rapports entre le liquide céphalo-rachidien et les éléments nerveux de l'axe cérébrospinal. *Arch Inter Physiol*, 1922, 17, 391–488.
- Su E.J., Fredriksson L., Geyer M., Folestad E., Cale J., Andrae J., Gao Y., Pietras K., Mann K., Yepes M., Strickland D.K., Betsholtz C., Eriksson U., Lawrence D., Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med*, 2008, 14, 731–737.
- Walter F.K., Die allgemeinen grunglagen des stoffaus tauscher zwischen dem zentralnervensystem und dem übrigen körper. *Arch Psychiat Nervenkr*, 1933, 101, 195–230.
- Wang H., Golob E.J., Su M.Y., Vascular volume and blood-brain barrier permeability measured by dynamic contrast enhanced MRI in hippocampus and cerebellum of patients with MCI and normal controls. *J Magn Reson Imaging*, 2006, 24, 695–700.
- Wang X., Lee S.R., Arai K., Lee S.R., Tsuji K., Rebeck G.W., Lo E.H., Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med*, 2003, 9, 1313–1317.
- Wang X., Tsuji K., Lee S.R., Ning M., Furie K.L., Buchan A.M., Lo E.H., Mechanisms of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke. *Stroke*, 2004, 35, 2726–2730.
- Westergaard E., Go G., Klatzo I., Spatz M., Increased permeability of cerebral vessels to horseradish peroxidase induced by ischemia in Mongolian Gerbils. *Acta Neuropathol*, 1976, 35, 307–325.
- Wolburg H., Neuhaus J., Kniesel U., Krauss B., Schmid E.M., Ocalan M., Farrell C., Risau W., Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci*, 1994, 107, 1347–1357.
- Yemisci M., Gursoy-Ozdemir Y., Vural A., Can A., Topalkara K., Dalkara T., Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med*, 2009, 15, 1031–1037.
- Yepes M., Sandkvist M., Moore E.G., Bugge T.H., Strickland D.K., Lawrence D.A., Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest*, 2003, 112, 1533–1540.
- Yepes M., Roussel B.D., Ali C., Vivien D., Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci*, 2009, 32, 48–55.
- Zacco A., Togo J., Spence K., Ellis A., Lloyd D., Furlong S., Piser T., 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci*, 2003, 23, 11104–11111.
- Zahler S., Kupatt C., Becker B.F., Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF-alpha. *Faseb J*, 2000, 14, 555–564.
- Zhang F.Y., Chen X.C., Ren H.M., Bao W.M., Effects of ischemic preconditioning on blood-brain barrier permeability and MMP-9 expression of ischemic brain. *Neurol Res*, 2006, 28, 21–24.
- Zhang X., Polavarapu R., She H., Mao Z., Yepes M., Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein mediate cerebral ischemia-induced nuclear factor-kappaB pathway activation. *Am J Pathol*, 2007, 171, 1281–1290.
- Zhang Y., Schuetz J.D., Elmquist W.F., Miller D.W., Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 311, 449–455.
- Zhao X., Ou Z., Grotta J.C., Waxham, N., Aronowski J., Peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) activation protects neurons from NMDA excitotoxicity. *Brain Res*, 2006, 1073–1074, 460–469.
- Zhou S.G., Lei X.Y., Liao D.F., 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*, 2003, 15, 159–162.