

■ Excitotoxicité et ischémie cérébrale : quoi de neuf ?

Entre cytokines et protéases

D. Vivien*, K. Benchenane*, C. Ali*

Outre son rôle vasculaire, des données récentes de la littérature nous permettent de considérer l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) comme un élément majeur du contrôle de l'homéostasie cérébrale. L'ambivalence de cette dernière est d'autant plus évidente lorsqu'elle est associée à un contexte pathologique tel que l'ischémie cérébrale.

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) constituent avec les différentes formes de cancer et les maladies cardio-vasculaires l'une des causes majeures de mortalité. Aux États-Unis, selon les dernières statistiques provenant de l'*American Heart Association*, environ une personne par minute est touchée par cette pathologie et 160 000 patients en décèdent chaque année. En France, on estime à plus de 150 000 le nombre de personnes touchées chaque année par cette pathologie vasculaire cérébrale. Les AVC constituent ainsi l'urgence clinique neurologique la plus fréquente dans les pays industrialisés et entraînent un coût très important en termes de santé publique, estimé à environ 10 000 à 15 000 euros par patient pour 3 mois de prise en charge médicale. Environ un quart des patients décèdent dans les 3 mois suivant l'accident, et environ la moitié dans les 12 mois post-infarctus cérébral. Si un quart des patients récupèrent sans séquelle évidente, les autres sont le plus souvent atteints de déficits neurologiques invalidants pouvant toucher différentes fonctions (motrices, spatio-temporelles, mnésiques, comportementales ou sensorielles) selon la localisation et l'étendue de la région cérébrale touchée. Même si les causes et les conséquences de cette affection semblent bien

connues, la prise en charge des patients touchés par cette maladie doit être profondément repensée. En effet, il devient urgent de mieux préparer, coordonner, informer les médecins des villes et des campagnes, les personnels des services hospitaliers quant aux règles à suivre et à l'urgence que représente cette pathologie. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant cette pathologie, associée à une meilleure information, fait vraisemblablement partie des nombreux points qui pourraient contribuer efficacement à améliorer la prise en charge des AVC. Ainsi allons-nous exposer dans cet article une partie des mécanismes qui contrôlent la mort neuronale ischémique et utiliser ces données pour montrer la complexité étiologique de cette affection.

L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE, UNE MALADIE NEURODÉGÉNÉRATIVE D'ORIGINE VASCULAIRE

On regroupe sous le terme d'AVC deux grands types distincts : les **AVC de type hémorragique**, consécutifs à la rupture d'un vaisseau cérébral, et les **AVC de type ischémique** (on parle d'infarctus cérébral) qui résultent de l'obstruction d'un vaisseau cérébral. On reconnaît classiquement deux phases distinctes au cours d'un accident ischémique : une **phase vasculaire** caractérisée par une réduction du débit sanguin cérébral, suivie d'une **phase d'altération du métabolisme des cellules du parenchyme cérébral** conduisant à la mort neuronale. La diminution de débit sanguin cérébral est graduelle. Ainsi, il existe un recrutement progressif de la zone de pénombre (altérations neuronales potentiellement réversibles) par le foyer ischémique (mort neuronale) jusqu'à sa totalité pendant les semaines qui suivent l'ischémie. Cette progression est contrôlée par une cascade d'événements qui évoluent dans l'espace et dans le temps. Les principaux processus impliqués dans cette cascade sont **l'excitotoxicité, l'apoptose et l'inflammation**. Cette brève description des différents éléments mis en jeu lors d'une ischémie cérébrale montre combien cette maladie d'origine vasculaire devient une maladie générale du cerveau dont les consé-



D. Vivien

* INSERM-Avenir, GIP Cycleron, Caen.

quences sur le parenchyme cérébral peuvent être dramatiques. Cette simple constatation montre clairement que le traitement de cette affection se doit de cibler l'interface entre le domaine vasculaire et le parenchyme cérébral.

LES RÉCEPTEURS DU GLUTAMATE AU CENTRE DES PERTURBATIONS ISCHÉMIQUES

Olney fut le premier à proposer, en 1969, la théorie de l'excitotoxicité (toxicité des acides aminés excitateurs) pour expliquer la propagation de la lésion ischémique cérébrale. Le glutamate, neurotransmetteur libéré de façon incontrôlée lors de la dépolarisation neuronale consécutive à un stress, va stimuler ses récepteurs postsynaptiques ionotropiques, qui sont de trois types : les récepteurs de l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA), de l'alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique (AMPA) et de l'acide kaïnique.

L'activation excessive des récepteurs NMDA joue un rôle prépondérant dans l'initiation de la cascade ischémique. Ils représentent la principale voie d'entrée du calcium dans la cellule lors d'une stimulation glutamatergique. Cette entrée massive de calcium va conduire à l'activation excessive et délétère d'une batterie d'enzymes cytosoliques : protéases, phospholipases, endonucléases, entraînant finalement la dégradation successive des composants nécessaires à la survie de la cellule.

LE CERVEAU PRÊT POUR LA CONTRE-ATTAQUE

Les processus délétères engagés par la cascade excitotoxique vont entraîner une réaction inflammatoire. Cette réaction est due dans un premier temps au recrutement de certaines cellules sanguines qui vont envahir rapidement le site de la lésion et engendrer une réaction inflammatoire locale, avec une activation microgliale (macrophages résidents) et astrocytaire. L'ensemble de ces phénomènes conduit alors à la synthèse rapide de facteurs pro-inflammatoires tels que le *platelet-activating factor*, le *tumor necrosis factor-alpha* (TNF α) ou

encore les interleukines (IL) IL-1 β et IL-6. Même si l'inflammation est souvent considérée comme un processus délétère au cours de l'ischémie cérébrale, de plus en plus d'études rapportent un effet neuroprotecteur de plusieurs cytokines exprimées par le tissu cérébral au cours de la phase inflammatoire de l'ischémie. C'est dans cette optique que notre équipe CNRS UMR 6551 du centre Cyceron a étudié les mécanismes par lesquels l'une de ces cytokines, le *transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1), pouvait influencer la mort neuronale d'origine ischémique.

TGF- β ET ISCHÉMIE CÉRÉBRALE

Nous avons tout d'abord mis en évidence une expression constitutive des trois isoformes de TGF- β et de leurs récepteurs au niveau du cortex cérébral de souris et dans des cultures primaires de neurones et d'astrocytes corticaux de souris. Dans une étude réalisée après ischémie focale permanente chez le rat, nous avons confirmé une surexpression des messagers et des protéines des TGF- β dans la zone de tissu en souffrance. Ces résultats ont été validés sur un modèle d'ischémie cérébrale permanente chez le primate non humain (babouin), modèle dans lequel nous avons montré une corrélation entre l'augmentation importante du niveau d'expression du TGF- β 1 et l'étendue du déficit métabolique estimé par tomographie à émission de positrons [TEP] (1).

LE TGF- β ENDOGÈNE PRODUIT EN RÉPONSE À UN STRESS ISCHÉMIQUE LIMITE L'EXTENSION DES LÉSIONS

Afin de déterminer le rôle endogène joué par le TGF- β dans l'évolution de la lésion ischémique, nous avons généré un récepteur soluble du TGF- β , capable d'"antagoniser" la fixation de cette cytokine sur ses récepteurs. Ainsi, dans un modèle d'ischémie focale transitoire chez le rat, nous avons démontré que le TGF- β endogène produit en réponse à un stress ischémique était capable de limiter l'extension de la

lésion. En effet, l'injection intrastructure de ce récepteur antagoniste du TGF- β conduit chez le rat à une très forte augmentation ($\times 3$) de la taille de la lésion cérébrale induite soit par l'injection intrastriale de l'agoniste glutamatergique NMDA, soit par une ischémie focale transitoire (2).

L'INHIBITEUR DE L'ACTIVATEUR DU PLASMINOGENÈ DE TYPE 1 (PAI-1) : UN MÉDIATEUR DE L'EFFET NEUROPROTECTEUR DU TGF- β

À la suite de ces résultats, nous avons entrepris d'étudier les mécanismes d'action du TGF- β sur la mort neuronale d'origine ischémique. Dans le cadre de cette étude, nous avons mis en évidence un effet neuroprotecteur du TGF- β vis-à-vis des atteintes excitotoxiques sur des cultures primaires de neurones et d'astrocytes corticaux de souris soumis à un stress en présence de NMDA. Au contraire, dans un modèle de cultures de neurones corticaux réalisées en

absence d'astrocytes, le TGF- β n'a pas montré d'effet neuroprotecteur vis-à-vis du stress excitotoxique. Ces résultats suggèrent que l'effet neuroprotecteur du TGF- β sur la mort neuronale d'origine ischémique serait dû à un processus dépendant des astrocytes. L'expression astrocytaire d'un récepteur dominant négatif du TGF- β bloque complètement cet effet neuroprotecteur, confirmant ainsi un rôle majeur des astrocytes. Nous avons alors démontré que l'effet neuroprotecteur du TGF- β nécessitait la néosynthèse au niveau astrocytaire d'une protéine inhibitrice de l'activateur de plasminogène (t-PA) appelée inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1, ou PAI-1 (3, 4). L'utilisation de la protéine PAI-1 sous sa forme recombinante et de cultures corticales contenant des astrocytes déficients pour le gène codant pour cette protéine a confirmé que l'effet neuroprotecteur du TGF- β était dépendant de la production de PAI-1 au niveau astrocytaire (figure 1). La question qui se posait alors était de comprendre les mécanismes qui faisaient de PAI-1 un agent neuroprotecteur.

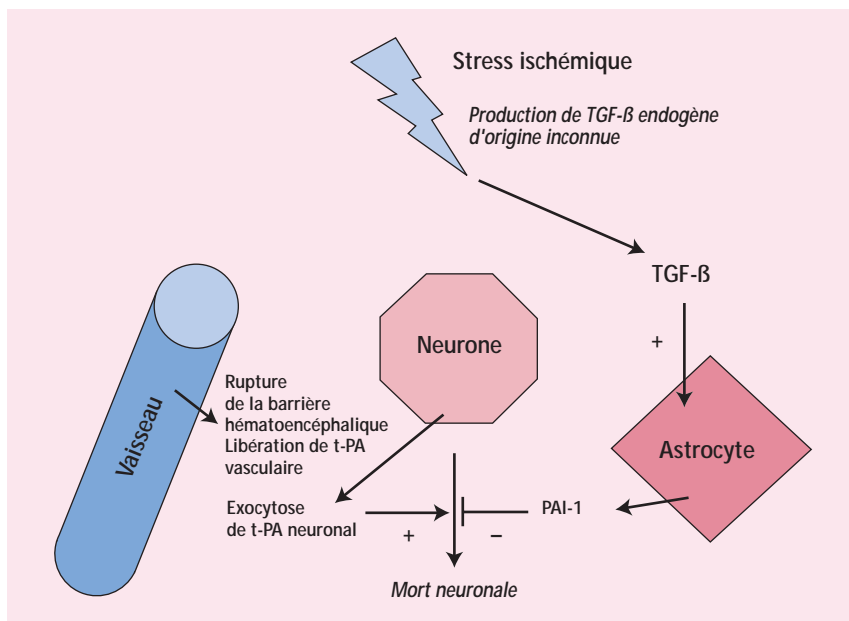


Figure 1. Mécanisme d'action du TGF- β sur la mort neuronale d'origine ischémique. Schématiquement, le TGF- β surexprimé consécutivement à un infarctus cérébral va, au niveau astrocytaire, induire l'expression massive d'une serpine, l'inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène de type 1 (PAI-1). Cette serpine va à son tour inhiber l'activité protéolytique du t-PA (d'origine vasculaire et/ou neuronale) et ainsi limiter les effets délétères du t-PA sur le contrôle de la mort neuronale.

L'ACTIVATEUR TISSULAIRE DU PLASMINOGENÈ (T-PA) CONTRÔLE POUR PARTIE LA PROPAGATION DE LA MORT NEURONALE EXCITOTOXIQUE

Ainsi, le rôle protecteur du TGF- β vis-à-vis de l'excitotoxicité médiée par le glutamate via la production astrocytaire de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène nous a amenés à émettre l'hypothèse selon laquelle il existerait, au contraire de PAI-1, une modulation positive de la mort neuronale induite par le NMDA via l'activateur tissulaire du plasminogène tissulaire (t-PA). En effet, PAI-1 est identifié comme l'un des plus puissants inhibiteurs du t-PA (figure 2). Nous avons utilisé un inhibiteur synthétique de l'activateur du plasminogène, le t-PA-STOP. La coïncubation de NMDA et de t-PA-STOP sur des cultures primaires de neurones corticaux a révélé un effet neuroprotecteur important induit par l'inhibition de l'activité protéolytique du t-PA. Des études parallèles réalisées avec la protéine recombinante de PAI-1

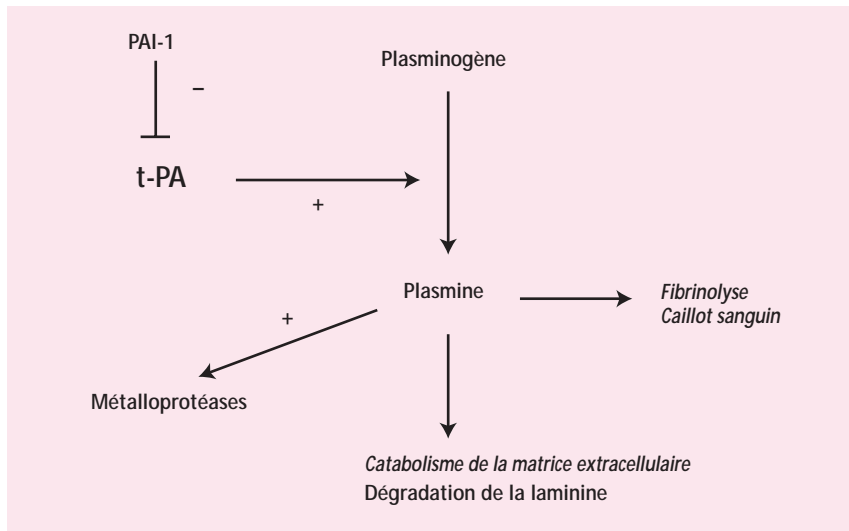


Figure 2. Fonctions du t-PA.
 Au niveau vasculaire, le t-PA va activer, par clivage protéolytique, le plasminogène en plasmine, laquelle plasmine va contrôler le métabolisme de la matrice extracellulaire (soit directement, soit indirectement par activation de métalloprotéases) et la dégradation des caillots de fibrine.

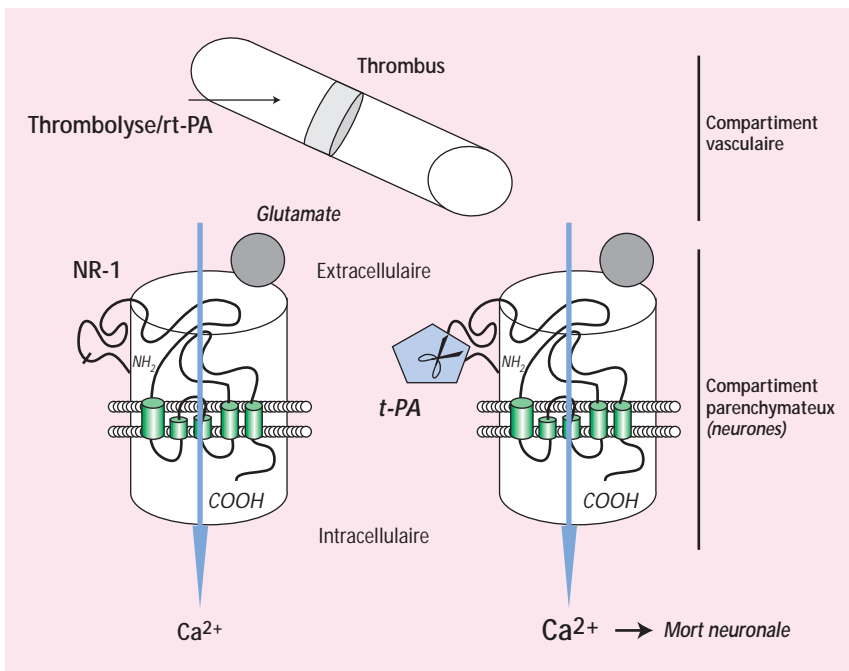


Figure 3. Mécanismes moléculaires expliquant comment une sérine protéase, le t-PA, peut contrôler la mort neuronale consécutive à une activation excessive des récepteurs NMDA.
 I : interaction entre le t-PA et la sous-unité canal des récepteurs NMDA ;
 II : clivage N-terminal de la sous-unité canal du récepteur NMDA-NR1 ;
 III : potentialisation de l'entrée de calcium intracellulaire ;
 IV : mort neuronale.

conforment nos résultats concernant le rôle modulateur du t-PA dans la neurotransmission glutamatergique. Ces résultats nous ont amenés à nous intéresser aux éventuelles interactions entre le t-PA et les récepteurs NMDA. Des expériences d'immunoprécipitations croisées et d'interaction protéique nous ont permis de montrer une interaction physique entre la sous-unité canal des récepteurs NMDA (NR-1) et le t-PA, suivie d'un clivage N-terminal de la sous-unité canal (NR-1) du récepteur NMDA, lequel est directement associé à une entrée massive de calcium intracellulaire à l'origine d'une potentialisation de la mort neuronale excitotoxique [figure 3] (5).

TGF-β, PAI-1 ET T-PA, UN TRIO POUR UNE NOUVELLE APPROCHE DU TRAITEMENT DE L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE

Parallèlement à ce que nous avons établi à partir de nos modèles expérimentaux (modèles animaux et cultures de neurones et d'astrocytes de rongeurs), la seule thérapeutique qui ait démontré une efficacité clinique pour le traitement des AVC est l'administration intraveineuse ou intra-artérielle de la forme recombinante humaine de ce même activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), utilisé comme agent thrombotique capable de restaurer le flux sanguin cérébral. C'est en 1995 que le *National Institutes of Health* recommanda l'utilisation du *tissue-type plasminogen activator* (t-PA) pour le traitement des maladies thromboemboliques. En effet, des travaux réalisés par le *National Institute of Neurological Disorders rt-PA Stroke Study Group* (1995) ont étudié l'effet d'une injection intraveineuse de t-PA recombinant (rt-PA) chez 624 patients, dans un intervalle de temps de moins de 3 heures après l'apparition des symptômes aigus. Ces travaux montrent que l'administration de rt-PA augmente de 11 à 13 % le nombre de patients indépendants et n'aggrave pas l'état clinique des autres patients, avec un effet bénéfique sur la réduction de la mortalité à 3 mois. Bien que le traitement par rt-PA réduise les dommages cellulaires induits par une ischémie cérébrale, il

augmente de 10 fois l'incidence des hémorragies intracérébrales. Malgré cela, l'injection intraveineuse de rt-PA a été approuvée par la *Food and Drug Administration* comme agent pharmacologique dans le traitement de l'ischémie cérébrale. Toutefois, son application est extrêmement limitée, puisque des données récentes estiment que seuls 1 à 5 % des patients américains victimes d'un infarctus cérébral ont été traités par une injection de rt-PA, et ce en raison d'une fenêtre d'utilisation extrêmement réduite (3 heures maximum après l'apparition des troubles neurologiques).

De plus, un autre problème potentiel relatif à l'utilisation du t-PA dans le traitement des AVC a été mis au jour par des travaux effectués sur des modèles animaux reproduisant la pathologie humaine. Au cours d'une ischémie cérébrale, le t-PA pourrait participer activement au processus conduisant à la mort neuronale (*figure 3*). Il a ainsi été observé que, à la suite d'une ischémie cérébrale, des souris génétiquement modifiées afin de ne plus exprimer de t-PA développaient des lésions cérébrales de 50 % plus petites que celles observées chez des souris normales (6). La question découlant de ces travaux était de savoir si l'administration de t-PA, à des fins thrombolytiques, pouvait potentialiser les atteintes ischémiques. La réponse à cette question a été apportée par une étude démontrant que l'injection intraveineuse de t-PA, chez des souris soumises à une occlusion d'une artère cérébrale ou à un stress excitotoxique, augmentait le volume des lésions (7, 8).

Le travail de notre équipe a permis de donner une explication à ces résultats en montrant que le t-PA libéré par les neurones en souffrance agissait conjointement avec le glutamate et contribuait à l'aggravation des lésions tissulaires consécutives à un AVC. Ainsi, nos travaux (11) démontrent que, dans le cadre du traitement des AVC par le t-PA, les effets bénéfiques associés à l'action antithrombotique du t-PA sont vraisemblablement minimisés par les effets délétères liés à son action sur la survie des neurones. Ils révèlent de plus une nouvelle piste thérapeutique pour le traitement de l'ischémie cérébrale. En effet, en

réduisant l'activité biologique du t-PA présent au niveau neuronal – grâce à un inhibiteur de ce dernier, PAI-1 –, nous avons réussi à sauver des neurones en culture de la mort induite par un stress excitotoxique. Il est donc envisageable que nous soyons à même, dans un avenir proche, de limiter les conséquences néfastes de l'occlusion d'une artère cérébrale en détruisant, d'une part, le caillot sanguin à l'origine de l'occlusion et en réduisant, d'autre part, l'activité du t-PA au niveau du parenchyme cérébral, et plus particulièrement au niveau neuronal. L'utilisation d'agonistes de la voie de signalisation du TGF- β ou celle d'inhibiteurs intraparenchymateux du t-PA pourraient constituer de nouvelles pistes de développement thérapeutique. L'utilisation d'antagonistes glutamatergiques classiques du type MK-801 ne s'est pas avérée efficace chez l'homme. Pourquoi ne pas envisager d'utiliser des antagonistes plus fins de la neurotransmission glutamatergique, visant non plus à bloquer l'action des récepteurs NMDA mais seulement à en moduler l'efficacité ? Des inhibiteurs de l'action du t-PA sur ces récepteurs auraient pour effet de s'opposer aux effets délétères de ce dernier sans en affecter le fonctionnement de base. De façon générale, c'est de la meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu au cours de l'ischémie cérébrale que naîtront de nouvelles perspectives de traitement. Si le large spectre d'action des cytokines limite fortement la possibilité d'une utilisation directe en clinique, l'étude de leurs modes d'action et de leurs cibles pourrait permettre la mise en évidence de nouveaux facteurs modulant la survie cellulaire. Une autre possibilité serait d'envisager l'utilisation en clinique d'un analogue du t-PA n'ayant pas d'effet direct sur le récepteur NMDA mais conservant son efficacité thrombotique. C'est le cas du DSPA (*desmodus rotundus salivary plasminogen activator* [DSPA], Desmoteplase®), un activateur du plasminogène isolé à partir de glandes salivaires de chauves-souris vampires, pour lequel les résultats des essais cliniques en cours dans le traitement des AVC sont attendus avec impatience (9).

RÉFÉRENCES

1. Ali C, Nicole O, Docagne F et al. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:956-66.
2. Ruocco A, Nicole O, Docagne et al. A transforming growth factor-beta antagonist unmasks the neuroprotective role of this endogenous cytokine in excitotoxic and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:1345-53.
3. Buisson A, Nicole O, Docagne F et al. Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor- β 1. *FASEB J* 1998;12:1683-91.
4. Docagne F, Nicole O, Marti HH et al. Transforming growth factor- β 1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB J* 1999;13:1315-24.
5. Nicole O, Docagne F, Ali C et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001;7:59-64.
6. Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 1995;377:340-4.
7. Nagai N, De Mol M, Lijnen HR, Carmeliet P, Collen D. Role of plasminogen system components in focal cerebral ischemic infarction: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation* 1999;99:2440-4.
8. Wang YF, Tsirka SE, Strickland S et al. Tissue plasminogen activator (t-PA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and t-PA-deficient mice. *Nat Med* 1998;4:228-31.
9. Liberatore GT, Samson A, Bladin C, Schleuning WD, Medcalf RL. Vampire bat salivary plasminogen activator (Desmoteplase®): a unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. *Stroke* 2003;34:537-43.