

Université de Montréal

**L'atorvastatine prévient l'apoptose précoce suivant une
lésion contusive médullaire thoracique et favorise la
récupération locomotrice**

par

Marc-André Déry

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences
en Pharmacologie
option Moléculaire

Aout, 2010

© Marc-André Déry, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

L'atorvastatine prévient l'apoptose précoce suivant une lésion contusive médullaire
thoracique et favorise la récupération locomotrice

Présenté par :
Marc-André Déry

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-François Gauchat, président-rapporteur
Dr. Guy Rousseau, directeur de recherche
Dr. Éric Beaumont, co-directeur
Dre. Maja Krajnovik, membre du jury

Résumé

L'administration systémique d'atorvastatine s'est montrée neuroprotective suivant un traumatisme médullaire, en diminuant la réponse inflammatoire au site de la lésion ainsi qu'en réduisant l'apoptose des oligodendrocytes. Ce dernier épargne la matière blanche au site de l'insulte et améliore la locomotion. Le but de cette étude était de confirmer l'efficacité neuroprotective de l'atorvastatine ainsi que son action précoce, lorsqu'administré post-trauma, sur la limitation de l'apoptose. Des rats Sprague-Dawley femelles ont reçu une injection intrapéritonéale de : (1) statine/saline (5 mg/kg) 2 h après une lésion contusive; (2) saline physiologique 2 h post-contusion; ou (3) saline physiologique sans lésion. Les rats traités à la statine ont montré une amélioration significative ($p < 0.05$) de leur locomotion après 4 semaines post-trauma, comparée au groupe « véhicule » lésé. Expliquant cette observation, l'activité de la caspase-3 fut diminuée de 50% ($p < 0.05$) et la méthode de TUNEL révéla une diminution d'approximativement 20% du nombre de cellules apoptotiques au site lésionnel ($p < 0.01$) 4 h après l'insulte contusive chez le groupe traité en comparaison aux groupes « véhicules ». Ces résultats démontrent que l'atorvastatine est efficace dans la prévention de l'apoptose précoce au site lésionnel dans un modèle expérimental de traumatisme médullaire après seulement 2 h post-traumatisme.

Mots-clés : Atorvastatine, Rats, Traumatisme médullaire, Apoptose, Locomotion

Abstract

The systemic administration of atorvastatin has been shown to be neuroprotective after spinal cord injury (SCI), by decreasing the inflammatory response at the lesion site and by reducing neuronal and oligodendrocyte apoptosis. The latter effect spares white matter at the injury site and improves locomotion. The aim of this study was to confirm the neuroprotective efficacy of atorvastatin as well as its early action in limiting apoptosis with its administration post-SCI. Female Sprague-Dawley rats received an intra peritoneal injection of: (1) statin/saline (5 mg/kg) at 2 h after the contusion injury; (2) physiological saline at 2 h post-SCI; or (3) physiological saline without injury. Statin-treated rats showed significant ($p<0.05$) improvement in locomotion at week 4 post-SCI compared to vehicle-treated animals. Explaining this outcome, caspase-3 activity decreased by 50% ($p<0.05$), and the histological TUNEL method revealed a decrease of approximately 20% in apoptotic cells at the injury site ($p<0.01$) at 4 h post-SCI in atorvastatin-treated rats in comparison to vehicle-treated controls. These data demonstrate that atorvastatin is effective after experimental spinal cord contusion injury in preventing early apoptosis at the injury site within 2 h post-administration.

Keywords : Atorvastatin, Rats, Spinal cord injury, Apoptosis, Locomotion

Table des matières

Chapitre 1 – Le traumatisme contusif médullaire.....	2
Épidémiologie.....	2
Dommmages primaires	3
Dommmages secondaires	4
Changements cardiovasculaires systémiques.....	4
Microvasculature locale	4
Stress oxydatif.....	6
Excitotoxicité	7
Médiateurs solubles de l’inflammation : prostanoïdes, cytokines et infiltration leucocytaire....	9
Cicatrice gliale et régénération axonale	13
Apoptose comme dommage secondaire post-TM.....	17
Signalisation intracellulaire de l’apoptose	17
L’apoptose dans le traumatisme médullaire.....	21
Apoptose précoce.....	22
Chapitre 2 – Les statines	34
Atorvastatine (<i>Lipitor</i>[®]).....	34
Pharmacocinétique.....	35
Pharmacodynamie.....	37
Chapitre 3 – Les hypothèses – L’atorvastatine dans le traitement du traumatisme médullaire contusif	42
Chapitre 4 – Atorvastatin prevents early apoptosis after thoracic spinal cord contusion injury and promotes locomotion recovery	47
Chapitre 5 – Discussion des résultats.....	61

Liste des abréviations

AAE : Acide aminé excitateur	Bim : <i>Bcl₂-Interacting Mediator of cell death</i>
ACV : Accident cérébro-vasculaire	BSCB : <i>Blood-Spinal Cord Barrier</i>
ADN : Acide désoxyribonucléique	BSEP : <i>Bile Salt Export Pump</i>
AIF : <i>Apoptosis Inducing Factor</i>	CCVD : Canaux Calciques Voltage-Dépendants
Akt : <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>	C _{max} : Concentration plasmatique maximale
AMPA : α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoazole-propionate	CMLV : <i>Cellules musculaires lisses vasculaires</i>
Ang II : Angiotensine II	CNTF : <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
AP-1 : <i>Activator Protein-1</i>	COX-2 : Cyclooxygénase 2
APP : <i>Amyloid Precursor Protein</i>	CRP : <i>C-Reactive Protein</i>
ASC : Aire sous la courbe	CRMP2 : <i>Collapsin Response Mediator Protein-2</i>
ATP: Adénosine triphosphate	CYP : Cytochrome P450
Bad : <i>Bcl₂-Associated Death promoter</i>	DP5 : <i>Death Protein 5</i>
Bak : <i>Bcl₂-Antagonist/Killer 1</i>	ED-1 : <i>Ectodermal Dysplasia-1</i>
Bax : <i>Bcl₂-Associated X protein</i>	EGF : <i>Epidermal Growth Factor</i>
BBB : Beattie, Basso, Bresnahan	Endo G : Endonucléase G
Bcl ₂ : <i>B-Cell Lymphoma 2</i>	ERK : <i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
Bcl-XL : <i>B-Cell Lymphoma-X-large</i>	FADD : <i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
BCRP : <i>Breast Cancer Resistance Protein</i>	
Bid : <i>BH3 Interacting Domain death agonist</i>	

FAS : <i>Apoptosis Stimulating Fragment</i>	MAPK : <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
GFAP : <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>	MBP : <i>Myelin Basic Protein</i>
GLT-1 : <i>Glutamate Transporter-1</i>	MCP-1 : <i>Monocytic Chemotactic Protein-1</i>
GPI : <i>Glycophosphatidylinositol</i>	MIP-1 : <i>Macrophage Inflammatory Protein-1</i>
GTP : <i>Guanosine triphosphate</i>	MLC : <i>Myosin Light Chain</i>
HMG-CoA : <i>3-hydroxymethylglutaryl-coenzyme A</i>	MLCP : <i>Myosin Light Chain Phosphatase</i>
HNE : <i>4-Hydroxynonéal</i>	MMP : <i>Matrix Metalloproteinase</i>
H ₂ O ₂ : <i>Peroxyde d'hydrogène</i>	MnSOD : <i>Manganèse Superoxyde Dismutase</i>
HtrA ₂ : <i>High Temperature Requirement protein A₂</i>	MPO : <i>Myéloperoxydase</i>
IAP : <i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>	mPTP : <i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>
ICAM : <i>Inter-Cellular Adhesion Molecule</i>	MRP2 : <i>Multidrug Resistant Protein 2</i>
IgG : <i>Immunoglobulin G</i>	NADPH : <i>Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate</i>
IL : <i>Interleukine</i>	NASCIS : <i>National Acute Spinal Cord Injury Study</i>
IP-10 : <i>Interferon gamma-induced Protein 10 kDa</i>	NeuN : <i>Neuronal Nuclei</i>
JNK : <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>	NF-κB : <i>Nuclear Factor κ light chain enhancer of activated B cells</i>
LDL : <i>Low-Density Lipoprotein</i>	NGF : <i>Nerve Growth Factor</i>
LIMK : <i>LIM Kinase</i>	NgR : <i>Nogo-66 Receptor</i>
L-NAME : <i>L-Nitro-Arginine Methyl Ester</i>	NMDA : <i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
MAG : <i>Myelin Associated Glycoprotein</i>	

NO [•] : Oxyde Nitrique	RANTES : <i>Regulation on Activation Normal T cells Expressed and Secreted</i>
NO ₂ ⁺ : Ion nitronium	RBD : <i>Ras-Binding Domain</i>
NOOO ⁻ : Peroxynitrite	RhoA : <i>Ras homolog gene family, member A</i>
NOS : NO Synthétase	ROCKII : <i>Rho-Associated Kinase II</i>
NS : Non-Significatif	ROS : <i>Reactive Oxygen Species</i>
O ₂ ⁻ : Anion Superoxyde	SAA : <i>Serum Amyloid A</i>
OATP C : <i>Organinc Anion Transporting Polypeptide C</i>	SOD : <i>Superoxyde Dismutase</i>
OH ⁻ : Ion Hydroxyle	SMAC : <i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspase</i>
OMgp : <i>Oligodendrocyte-Myelin glycoprotein</i>	SNC : <i>Système Nerveux Central</i>
p90RSK : <i>p90 Ribosomal S6 Kinase</i>	SPLA2 : <i>Soluble Phospholipase A2</i>
PARP : <i>Poly ADP Ribose Polymérase</i>	STAT-1 : <i>Signal Transducer and Activators of Transcription-1</i>
PCR : <i>Polymerase Chain Reaction</i>	t _{1/2} : <i>Demie-vie d'élimination</i>
PGI ₂ : Prostacycline	TGF-β : <i>Tumor Growth Factor-β</i>
PGH ₂ : Prostaglandine H ₂	TIMP-1 : <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1</i>
Pgp : P glycoprotéine	TM : <i>Traumatisme Médullaire</i>
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase	T _{max} : <i>Temps à l'obtention de la concentration plasmatique maximale</i>
PKA : Protéine Kinase A	TNF-α : <i>Tumor Necrosis Factor -α</i>
PKC : Protéine Kinase C	TNFR : <i>Tumor Necrosis Factor -α Receptor</i>
PLC : Phospholipase C	
PLP : <i>myelin Proteolipid Protein</i>	
PMN : Polymorphonucléaire	

t-PA : *Tissue Plasminogen Activator*

TUNEL : *Terminal deoxynucleotidyl
transférase dUTP nick end labelling*

TXA₂ : Thromboxane A₂

TXB₂ : Thromboxane B₂

UGT : UridinediphosphoGlucoronyl
Transférases

XIAP : *X-linked Inhibitor of Apoptosis
Protein*

ZO-1 : *Zona Occludens-1*

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 Représentation schématique sommaire des relations entre les principaux intermédiaires régissant le processus apoptotique.....20

Chapitre 2

Figure 2.1 Représentation des agents enzymatiques et intermédiaires menant à la synthèse du cholestérol.....38

Chapitre 4

Figure 1.....57

Figure 2.....58

Figure 3.....59

Chapitre 5

Figure 5.1 Modes d'actions potentiels de l'atorvastatine dans l'atténuation de l'apoptose précoce post-TM et dans l'amélioration de la récupération locomotrice.....67

Liste des tableaux

Chapitre 4

Table 1.....60

*À mes parents, pour leur support et
encouragements...*

Remerciements

J'aimerais prendre le temps de remercier toutes les personnes qui m'ont supportées, de près ou de loin, dans mes études de maîtrise.

Tous d'abord, je dois exprimer ma reconnaissance envers mon directeur de recherche, le Dr. Guy Rousseau. Depuis plusieurs années, le Dr. Rousseau a orienté ma recherche, s'est toujours montré disponible et a constamment fait preuve de foi en mes capacités. Il représente une figure très importante de ma formation scientifique et je l'en remercie. Je remercie également le Dr. Éric Beaumont pour son appui, ses mots d'encouragement, ainsi que, plus récemment, pour sa compréhension.

Je ne peux non plus passer sous silence l'équipe du Dr. Rousseau, sans qui la vie au labo ne serait pas la même. Ainsi, je remercie tout particulièrement Sévan Kaloustian et Thierno Madjou Bah pour leur sagesse et multiples conseils; Stéphanie-Anne Girard, Laura Lada-Moldovan et Jessica Arseneault-Bréard pour leur bonne humeur et leurs encouragements ainsi qu'Isabelle Rondeau, Kim Gilbert et Thuy Tran Quang pour les nombreuses conversations et leur curiosité scientifique. Merci aussi aux multiples stagiaires pour leurs questions et leur aide.

J'exprime aussi ma gratitude envers l'expertise des gens œuvrant au centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, particulièrement à Pierre Fortier, Caroline Bouchard et Louis Chiochio, ainsi qu'à Chantal Fournier pour ses précieux conseils techniques.

Finalement, j'éprouve une profonde gratitude envers ma famille, particulièrement mes parents. Si je fais ce que j'aime aujourd'hui, c'est en partie grâce à eux. Également, merci à Patricia Brown qui partage avec moi au quotidien les hauts et les bas de la recherche.

Introduction

Le fardeau émotionnel et économique associé aux séquelles d'un traumatisme médullaire (TM) et de leur prise en charge justifie tristement la nécessité de poursuivre les efforts de prévention déjà déployés. Cependant, en ce qui concerne le traitement de la population atteinte, l'immense besoin d'options thérapeutiques vient malheureusement souligner son manque flagrant. En effet, à ce jour, l'approche traditionnelle, depuis les études NASCIS (*National Acute Spinal Cord Injury Study*) des années 80-90, est l'utilisation précoce, quoique contestée (Hurlbert, 2000, Thuret et al., 2006), de l'anti-inflammatoire stéroïdien méthyprednisolone (Blight, 2002).

Une multitude de voies ont été empruntées dans l'espoir de favoriser cliniquement une réduction des séquelles et de la morbidité. Parmi ces pistes de recherche, on compte plusieurs approches cellulaires, moléculaires et de réhabilitations prometteuses. En ce sens, la recherche fondamentale étudiant l'étiologie et le développement des dommages causés à la moelle épinière favorise, à mon avis, l'élaboration de stratégies avérées et représente une source d'espoir dans le traitement de ce trouble. Par exemple, l'identification du rôle crucial que joue l'inflammation dans les dommages encourus lors d'un traumatisme médullaire a orienté plusieurs approches.

Parallèlement, la recherche a permis d'observer et de caractériser l'apoptose et comment sa réduction dans la moelle épinière suivant un traumatisme pouvait se traduire en une diminution des pertes locomotrices fonctionnelles (Li et al., 2000, Colak et al., 2005, Sribnick et al., 2007, Arnold et al., 2000). En raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, les statines ont suscité l'intérêt dans l'atténuation des dommages secondaires et leurs effets bénéfiques dans le traitement expérimental des traumatismes médullaires ou cérébraux furent démontrés à plusieurs reprises (Lu et al., 2004a, Pannu et al., 2005, Pannu et al., 2007, Holmberg et al., 2006, Hong et al., 2006, Schmeer et al., 2006). En particulier, l'atorvastatine (Lipitor[®], Pfizer), s'est récemment montrée particulièrement efficace (Lu et al., 2004c, Lu et al., 2004a, Pannu et al., 2005, Pannu et al., 2007). Ce mémoire se consacre donc à ses propriétés protectrices sur l'apoptose et la récupération locomotrice post-trauma contusif.

Chapitre 1 – Le traumatisme contusif médullaire

Épidémiologie

Le traumatisme médullaire sévère et la morbidité qui y est associée entraînent une lourde charge tant émotive, chez le patient, qu'économique, sur la société. En effet, quoiqu'on évalue qu'à 330 000 et à entre 227 080 et 300 938, le nombre de patients ayant souffert d'un traumatisme médullaire, en Europe et aux États-Unis respectivement, les coûts découlant des soins prodigués en sol américain s'élevaient, en 1990, à 4 milliard US\$ par année (Onose et al., 2009, Sekhon and Fehlings, 2001), voire même à 9,7 milliard US\$ (NCIPC, Septembre 2006). Sur une échelle globale, le nombre de personnes souffrant de cette condition, à divers degrés, s'élevait en 2006 à 2,5 millions, auxquels s'ajoutaient 130 000 nouveaux cas par année (Thuret et al., 2006).

De plus, il est navrant de constater les causes, souvent parables, de ce type de traumatisme. En effet, on observe que les accidents de nature routière, principale cause de traumatismes médullaires, sont responsables d'environ 40% des cas, selon les sources (NSCISC, Avril 2009) (Sekhon and Fehlings, 2001, DeVivo, 1997). En 2009, on comptait également parmi les causes, les chutes (26,7%), la violence (15,1%) et les sports (7,6%), laissant 8,6% à des causes inconnus ou autres (NSCISC, Avril 2009).

Autre élément déplorable, l'âge auquel les patients subissent un traumatisme de la moelle épinière est particulièrement bas, quoique l'on observe une augmentation progressive de celui-ci. En effet, dans le passé (1973-79), la majorité des cas se produisaient entre 16 et 30 ans. Depuis, l'âge moyen a passé à 35,3, en 1990, puis à 40,2 ans, en 2005 (NSCISC, Avril 2009)(Sekhon and Fehlings, 2001).

Les traumatismes médullaires peuvent être la conséquence d'une lésion contusive, compressive ou ischémique, d'un étirement (*stretch*), d'une lacération ou d'un sectionnement de la moelle épinière (Sekhon and Fehlings, 2001, Mauter et al., 2000). Cette lésion peut avoir une multitude d'origines et l'atteinte à la moelle peut se faire à divers endroits, tant au niveau cervical (C1 à C7-T1), thoracique (T1-T11), thoracolumbaire (T11-T12 à L1-L2) que lombosacré (L2-S5) (Sekhon and Fehlings, 2001). Le

niveau et la nature de la lésion auront naturellement une incidence directe sur l'étendue ainsi que la sévérité de l'atteinte neurologique et influenceront ultimement la prise en charge et le traitement du patient.

Cependant, devant l'étendue des formes que peuvent prendre les traumatismes médullaires, ce mémoire ne portera que sur l'insulte de nature contusive, en raison de sa pertinence clinique, et fut représentée expérimentalement par une contusion thoracique moyenne (30 g·cm) au niveau du segment vertébral T10. Cette contusion touche donc directement la région dorsale du segment, région composée de matière blanche et abritant les faisceaux Graciles, les voies post-synaptiques des colonnes dorsales, les faisceaux dorso-latéraux et, plus profondément, les faisceaux pyramidaux. La région dorsale du segment contient également les colonnes postérieures de matière grise composée des lames 1 à 5. Ces colonnes se prolongent jusqu'au centre du segment, où l'on retrouve le reste de la matière grise, composée des noyaux dorsaux (de Clarke), des noyaux intercalés, des colonnes intermedio-médiales et -latérales, des lames 7 à 10 et des motoneurones musculaires de la paroi thoraco-abdominale et des muscles axiaux, tous deux dans la lame 9. Finalement la région antéro-latérale entourant la matière grise est formée des noyaux spinaux latéraux, de la voie rubrospinale, et des faisceaux latéraux et ventraux (Rat Spinal Cord Atlas, Christopher & Dana Reeve Foundation). Notons que cette disposition de la matière grise à l'intérieur des faisceaux de matière blanche, ainsi que leur différence de flexibilité, auront une incidence sur les dommages vasculaires (Tator and Koyanagi, 1997, Mauter et al., 2000).

Domages primaires

On qualifie de dommages primaires les dommages initiaux causés à la moelle épinière par la lésion initiale. En ce qui concerne ce travail, la contusion des axones neuronaux de la matière blanche et des corps cellulaires de la matière grise sous-jacente résulte en la mort d'une certaine proportion de cellules. Malheureusement, la nature virtuellement imprévisible de l'impact ne laisse pour traitement que la prévention et se prête mal à une

quelconque action pharmacologique. Par conséquent les dommages primaires ne seront pas discutés davantage dans le cadre de ce mémoire.

Dommages secondaires

Suite à la lésion initiale, une série d'événements, circonscrit au site traumatique ou d'ordre systémique, prennent place.

Changements cardiovasculaires systémiques

Le traumatisme entraîne parfois une augmentation transitoire du rythme cardiaque et de la pression artérielle, possiblement dépendante des ganglions sympathiques thoraciques et des surrénales (Sekhon and Fehlings, 2001). Puis, l'endommagement des fibres efférentes sympathiques au site du traumatisme mène à une chute soudaine du tonus sympathique situé en aval de la lésion. Cette diminution se traduit, notamment, par une chute du tonus vasoconstricteur du lit vasculaire desservi par les fibres nerveuses lésées. Ceci mène à une vasodilatation massive qui se répercute sur la pression artérielle et résulte en une hypothermie et une hypotension pouvant aller jusqu'au choc neurogénique et dont l'ampleur est tributaire du site de la lésion (Tator, 1995, Sekhon and Fehlings, 2001). Ces changements systémiques, quoique pertinents d'un point de vue clinique, ne seront pas discutés davantage. Une attention particulière sera cependant accordée à la perturbation microvasculaire.

Microvasculature locale

D'un point de vue vasculaire, la contusion entraîne une disruption vasculaire causant plusieurs hémorragies pétéchiqes dans la matière grise au cours des premières minutes (3-15 min) (Liu et al., 1997, Tator and Fehlings, 1991, Anderson and Hall, 1993) ainsi que de l'œdème dans la matière blanche (Tator and Fehlings, 1991). Dans les premières heures suivant la lésion, l'hémorragie s'accroît (laisse place à une nécrose hémorragique dans les 24-48 h) et l'on observe la perte de faisceaux de myéline et une dégénération axonale à 4 h

post-TM (Tator and Fehlings, 1991, Anderson and Hall, 1993). Cette dégénération qui est observée dès 15 min, se poursuit dans les 24 h suivantes et est caractérisée microscopiquement par un gonflement de l'axone, une accumulation d'organelles autour des neurofilaments axonaux, la formation d'un espace périaxonal et de vésicules de myéline, ainsi que par la rupture de l'axolemme (Tator, 1995). Après quelques jours, le site hémorragique laisse place à de la cavitation et à une nécrose de coagulation (Tator and Fehlings, 1991).

Dans sa revue de littérature, Taoka *et al.* rapporte l'existence d'une dichotomie entre la perturbation de la perfusion de la matière blanche et grise, la première étant transitoire (5-15 min) tandis que la seconde serait plus durement atteinte par les forces de cisaillement mécanique et résulterait généralement en une ischémie (Taoka and Okajima, 1998, Mauter et al., 2000).

Ainsi, la perte de l'intégrité microvasculaire de la moelle est suivie par un dysfonctionnement de l'autorégulation, une hémostasie et établit un environnement cellulaire hypoxique qui prévient la production d'ATP (adénosine triphosphate). Ceci cause un dysfonctionnement du transporteur Na^+/K^+ -ATPase, la baisse du potentiel membranaire et contribue à l'œdème cellulaire (Taoka and Okajima, 1998, Mauter et al., 2000). De plus, cette déstabilisation de l'homéostasie énergétique mène à une accumulation de métabolites et à une acidification lactate-dépendante. Cette acidification est d'autant plus exacerbée par l'entrée massive de sodium intracellulaire, *via* les canaux sodiques voltage-dépendants et l'inactivité de la Na^+/K^+ -ATPase, en accentuant l'activité de l'échangeur protonique Na^+/H^+ (Agrawal and Fehlings, 1996).

L'œdème, notablement dans la matière blanche, suivant le traumatisme médullaire est intimement lié à la perméabilité de la barrière hémato-médullaire (Mauter et al., 2000). Cette barrière retrouvée au niveau des capillaires, est structurellement constituée, selon Mauter *et al.*, par les jonctions serrées liant les cellules endothéliales, la présence de glycocalyx sur la surface luminale et par la membrane basale abluminale (Mauter et al., 2000). Lorsque compromise, par l'action de l'endothéline-1 ou des metalloprotéinases lors

de l'inflammation, par exemple, celle-ci permet le passage au parenchyme de médiateurs solubles (cytokines, prostanoïdes, etc.), d'acides aminés excitateurs ainsi que de leucocytes, tous pouvant contribuer aux dommages secondaires (Mautès et al., 2000).

Finalement, suivant l'ischémie, la reperfusion entraîne une vague oxydative (Mautès et al., 2000), notamment d'origine mitochondriale qui, en raison de l'interruption transitoire de la perfusion, affecterait probablement davantage la matière blanche. Les radicaux libres produits auront alors comme cible les protéines, les acides nucléiques, mais aussi les lipides membranaires, qui en subissant une peroxydation, contribueront à l'instabilité membranaire, à l'œdème et éventuellement à la lyse cellulaire.

Stress oxydatif

Le stress oxydant désigne le potentiel cytotoxique découlant d'un déséquilibre entre les agents antioxydants (Catalase, Glutathionne Déshydrogénase, Glutathionne Peroxydase, Superoxyde Dismutase, Acide Ascorbique, α -Tocophérol, etc.) et les médiateurs oxydants, souvent appelés ROS (*Reactive Oxygen Species*), tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), l'ion hydroxyle (OH^{\cdot}), le peroxydite (NOO^{\cdot}) et l'oxyde nitrique ($^{\cdot}NO$) (Loh et al., 2006). Lorsqu'en surabondance par rapport aux défenses antioxydantes, ces molécules réagissent avec les composantes cellulaires (lipides membranaires, protéines, acides nucléiques) et peuvent mener à la mort de la cellule, par nécrose ou apoptose.

Le superoxyde peut être considéré comme espèce réactive primaire et peut être d'origine mitochondriale, ou enzymatique, *via* la NADPH oxydase (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase). Cette enzyme inductible lors de la reperfusion est présente à la membrane cellulaire ainsi que chez les leucocytes et génère une vague oxydative initiée par la production de superoxyde (Hong et al., 2006). Le pouvoir cytotoxique du superoxyde serait cependant accompli par les ROS secondaires, tel l'ion hydroxyle et le peroxydite, issus de sa réactivité extrêmement rapide (par exemple, $6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ avec le $^{\cdot}NO$) (Liu et al., 1998). Salvemini *et al.* décrit les principales

contributions du superoxyde à l'inflammation comme étant : l'endommagement endothélial, l'induction de l'expression des molécules d'adhésion, la destruction de la noradrénaline et de l'adrénaline, la peroxydation des lipides, l'endommagement de l'ADN (acide désoxyribonucléique) ainsi que l'activation de PARP (*Poly ADP Ribose Polymérase*). Le superoxyde activerait également les facteurs de transcriptions NF- κ B (*Nuclear Factor κ light chain enhancer of activated B cells*) et AP-1 (*Activator Protein-1*), enclenchant l'expression de gènes pro-inflammatoires (Salvemini et al., 2006). De plus, on reconnaît au superoxyde la capacité d'inhiber la Na^+/K^+ -ATPase (Hexum and Fried, 1979). Le $\cdot\text{NO}$ peut être, quant à lui, produit par les isoformes de la NO synthétase (NOS), endothéliale, neuronale et inductible (Lewen et al., 2000). La réaction du $\cdot\text{NO}$ avec l'anion superoxyde génère le peroxydinitrite, ou acide peroxydinitrique, une espèce très réactive (Liu et al., 1998). En effet, en plus de réagir avec les protéines, le peroxydinitrite inhiberait l'action de la MnSOD (Manganèse Superoxyde Dismutase), diminuerait la production de prostacycline (PGI_2) ainsi que la réponse au glucocorticoïdes, induirait COX_2 , augmenterait la concentration de glutamate extracellulaire et diminuerait la formation de noradrénaline (Salvemini et al., 2006).

Les ROS, tel que mentionné, peuvent réagir avec les lipides membranaires qui, à leur tour peuvent accomplir une action cytotoxique. L'un d'entre eux, le 4-hydroxynonéal (HNE), produit de l'oxydation de phospholipides polyinsaturés, contribuerait potentiellement à l'excitotoxicité en inhibant le transporteur astrocytique GLT-1 (*Glutamate Transporter-1*) (Keller et al., 1997) causant une accumulation du glutamate extracellulaire, ou par l'inhibition de la Na^+/K^+ -ATPase (Siems et al., 1996), ce qui entraînerait une dépolarisation favorable à l'entrée de calcium *via* le récepteur NMDA (*N-methyl-D-aspartic acid*) (Springer et al., 1997, Malecki et al., 2000).

Excitotoxicité

À ce propos, l'environnement cellulaire post-TM est marqué par une accumulation toxique d'acides aminés excitateurs (Panter et al., 1990, Liu et al., 1991, Liu et al., 1999b), qui

agissent sur les récepteurs NMDA, AMPA (*α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoazole-propionate*) ou Kainate et stimule l'entrée cellulaire de calcium et de sodium, en plus d'activer les récepteurs métabotropiques glutamatergiques (Hirbec et al., 2001). Cette entrée calcique massive peut perturber l'homéostasie mitochondriale et stimuler la relâche de facteurs pro-apoptotiques, mais fut également démontrée comme pouvant causer la mort cellulaire par nécrose (Nicotera and Orrenius, 1998). En effet, il semblerait que la concentration et le temps d'exposition constituent les paramètres régissant la nature de la mort cellulaire en réponse au NMDA (Bonfoco et al., 1995). L'influx calcique AMPA- et Kainate-dépendant est reconnu aussi comme entraînant la production de radicaux libres, chez les neurones corticaux (Carriedo et al., 1998). Bien que ces résultats concernent les cellules cérébrales, notons que les neurones spinaux furent démontrés comme étant plus sensibles à l'excitotoxicité d'origine AMPA/Kainate que les neurones corticales (Regan, 1996).

Parallèlement, l'entrée sodique dépolarise la cellule, exacerbant l'entrée calcique par les canaux calciques voltages-dépendants (CCVD) et mène à l'œdème cellulaire tandis que la stimulation métabotrope active la PLC (Phospholipase C) et la PKC (Protéine Kinase C) tout en favorisant la relâche inositol triphosphate-dépendante des stocks calciques endoplasmiques (Hirbec et al., 2001). Cependant, il est important de souligner l'importance de la source calcique sur sa toxicité. En effet, l'entrée de calcium NMDA-dépendante serait beaucoup plus néfaste que celle provenant des CCVDs (Arundine and Tymianski, 2003). De plus, il est pertinent de préciser qu'il existe trois groupes de récepteurs glutamatergiques métabotropiques et qu'on attribue au groupe I un rôle neurotoxique dans l'excitotoxicité, tandis que les groupes II et III seraient davantage protecteurs (Mills et al., 2001). Cependant, une étude récente portant sur le mGluR5, appartenant au groupe I, suggère que dans un contexte sub-chronique, la stimulation de ce récepteur puisse diminuer la neurotoxicité microgliale, ce qui attribuerait au glutamate un potentiel rôle physiologique dans la récupération post-trauma (Byrnes et al., 2009).

Parmi les premières évidences pointant vers le rôle de l'excitotoxicité dans la pathophysiologie du traumatisme médullaire on remarque l'inhibition du récepteur NMDA par le MK801 (Faden et al., 1988, Faden and Simon, 1988), puis par la gacyclidine (Gaviria et al., 2000, Hirbec et al., 2001) et le constat de leurs effets protecteurs sur les plans locomoteurs et anatomiques. Également, l'observation des effets bénéfiques de l'inhibition des canaux non-NMDA, suivit de l'étude de la protection dose-dépendante conférée par l'inhibiteur AMPA/Kainate NBQX sur la fonction locomotrice et la préservation post-TM, vint confirmer l'implication des canaux AMPA et/ou Kainate dans l'excitotoxicité post-TM (Wrathall et al., 1992a, Wrathall et al., 1992b, Wrathall et al., 1994). Celle-ci fut étudiée davantage dans les années qui suivirent (Agrawal and Fehlings, 1997, Wrathall et al., 1997, Rosenberg et al., 1999) et ce même inhibiteur, le NBQX, fut démontré comme pouvant améliorer la fonction mitochondriale ainsi que le potentiel oxydant suivant un traumatisme contusif de la moelle épinière chez le rat (Mu et al., 2002). Étrangement, l'étude de l'expression des sous-unités du récepteur AMPA suivant un traumatisme médullaire montre que GluA₂, sous-unité conférant une imperméabilité calcique à ce récepteur, voit son expression thoracique diminuée lors des premiers 24 h post-TM, ce qui contribue probablement à l'excitotoxicité post-TM ainsi qu'à la sévérité des dommages (Grossman et al., 1999). Globalement, ces résultats supportent un rôle important de l'excitotoxicité comme dommage secondaire post-TM.

Médiateurs solubles de l'inflammation : prostanoides, cytokines et infiltration leucocytaire

Le glutamate, tout comme certaines cytokines pro-inflammatoires, facteurs de croissance ou endotoxines, contribue à l'induction de la cyclooxygénase 2 (COX-2), enzyme limitante dans la production des prostanoides (Prostaglandines et Thromboxane), dont on remarque l'augmentation lors du traumatisme médullaire. Pour cause, cette enzyme est inductible lors de l'inflammation et voit sa production augmentée près de la lésion dès 30 min (max à 3 h), et est présente à 24 h chez l'humain, particulièrement chez les polymorphonucléaires

(PMN) (Bao et al., 2009, Vanegas and Schaible, 2001) et l'endothélium, mais pas chez les astrocytes, neurones, macrophages, monocytes ou microglie à 6 h post-TM (Adachi et al., 2005). Le produit de cette réaction, co-générateur du superoxyde, est la PGH₂, une prostaglandine substrat des différentes synthétases, dont l'expression varie d'un tissu à l'autre, pour former les prostaglandines D₂ et E₂, la PGI₂ ou le Thromboxane (TXA₂) (Vanegas and Schaible, 2001).

Parmi les prostaglandines induites par le TM, on note principalement la prostaglandine vasoconstrictrice F_{2α} dont la concentration quadruple 15 min suivant un TM au site traumatique et dont l'administration expérimentale, pendant une heure, entraîne une perte neuronale significative *in vivo* (Liu et al., 2001). De plus, cette prostaglandine semble entretenir une boucle de rétroaction positive avec l'ion hydroxyle (Liu and Li, 1995, Liu et al., 2001). L'étude du TXB₂, un dérivé stable et inactif du TXA₂ indique également une production soudaine du TXA₂, atteignant un maximum dès 2 h post-trauma (Resnick et al., 2001). En effet, ces niveaux de TXA₂ se trouvent augmentés suivant un traumatisme médullaire contusif, mais corrélaient aussi avec son intensité et exacerberaient les dommages secondaires par son pouvoir pro-aggrégant et micro-embolisant, face à une production de PGI₂ inchangée lors du TM (Hsu et al., 1986). En effet, on observe un effet bénéfique sur la perfusion post-trauma de l'antagonisme du récepteur au TXA₂ (Tempel and Martin, 1992). Malheureusement, l'absence de variation de PGI₂ suivant un TM peut s'avérer frustrante considérant les propriétés protectrices de son analogue l'iloprost sur la récupération post-trauma compressif et sur l'accumulation leucocytaire (Taoka et al., 1997).

Finalement, devant les effets pro-inflammatoires des produits de COX-2 dans le TM, il n'est pas surprenant de constater que son inhibition *in vivo*, via le NS-398 ou le SC58125, se traduise par une amélioration de la récupération locomotrice après quatre semaines (Hains et al., 2001, Resnick et al., 1998).

Comme mentionné auparavant, les cytokines pro-inflammatoires, particulièrement le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) et l'IL-1 β , furent démontrés comme pouvant induire l'expression de COX-2 dans le système nerveux central (SNC) (Serou et al., 1999, Tonai et al., 1999, Tonai et al., 2002). Ceci introduit ces médiateurs de l'inflammation dont on remarque la relâche soudaine, mais relativement passagère, post-TM contusif et qui accomplissent plusieurs rôles, notamment le recrutement leucocytaire au site traumatique (Bartholdi and Schwab, 1997).

Le TNF- α et l'IL-1 β voient leur expression augmentée dans la première heure dans des modèles de compression et de contusion chez la microglie murine et de rat (Rice et al., 2007, Yang et al., 2005), tout comme l'IL-6, dont la sécrétion par les astrocytes augmente en réponse à TNF- α et l'IL-1 β chez le rat (Yang et al., 2005, Benveniste et al., 1990). De plus, cette augmentation pour TNF- α , IL-1 β et IL-6 atteint un maximum (globalement vers 1 h pour TNF- α et 6 h, 12 h ou 24 h pour IL-1 β et -6, selon les auteurs) et s'estompe généralement dans les 24 h post-TM dans des contextes expérimentaux de contusion et compression (Yang et al., 2005, Lee et al., 2000b, Wang et al., 1996, Wang et al., 1997, Pineau and Lacroix, 2007, Bartholdi and Schwab, 1997). Chez l'humain, on note que cette évolution temporelle est globalement corroborée par l'étude de marquages immunohistochimiques *post-mortem* de moelles épinières traumatiques (Yang et al., 2004). Quoique qu'il existe une certaine discordance entre les constats expérimentaux concernant la cinétique de production des cytokines pro-inflammatoires, on retient qu'il s'agisse d'un phénomène aiguë, soudain et passager.

Il existe cependant un certain consensus en ce qui concerne les dommages que peuvent entraîner directement ou indirectement, ces cytokines pro-inflammatoires dans les dommages secondaires post-TM. Par exemple, chez le rat, le TNF- α entraînerait la mort par apoptose, particulièrement des neurones et microglies, suivant un TM (Yune et al., 2003) tout comme l'IL-1 β (Nesic et al., 2001). Également, l'IL-6 favoriserait l'astroglie et préviendrait la récupération locomotrice (Okada et al., 2004) tandis que l'administration d'un hyper-IL-6 (IL-6 conjuguée à la chaîne α de son récepteur), résulte en une

augmentation de l'infiltration des neutrophiles, de l'activation de la microglie et de la taille de la lésion ainsi qu'en une diminution de la croissance axonale (Lacroix et al., 2002).

De plus, le TM est accompagné par la production un peu plus tardive, mais plus persistante (environ de 1 à 7 jours ou diminuant vers 24 h, selon les auteurs) de chémokines telles MCP-1 (*Monocytic Chemotactic Protein-1*), MIP-1 (*Macrophage Inflammatory Protein-1*) et -2, IP-10 (*Interferon gamma-induced Protein 10 kDa*) et RANTES (*Regulation on Activation Normal T cells Expressed and Secreted*) (Rice et al., 2007, Lee et al., 2000b).

Ces chémokines chémotaxiques recrutent d'abord les PMN, maximum de 4 à 24 h selon les auteurs (Hamada et al., 1996, Katoh et al., 1997, Carlson et al., 1998), puis les macrophages vers 48 h post-trauma (Carlson et al., 1998, Anderson and Hall, 1993, Isaac and Pejic, 1995, Tator, 1995). Le déphasage entre la production de cytokines/chémokines et l'accumulation des leucocytes ainsi que sa co-localisation avec les cellules résidentes du site traumatique supporte l'idée admise que le second événement soit dépendant de la relâche de cytokines par ces cellules locales (i.e. neurones, microglie etc.) et non l'inverse (Yang et al., 2005).

En ce qui concerne le rôle que jouent les PMN dans les dommages secondaires, il fut notamment mis en évidence par l'injection d'anticorps monoclonaux contre P-sélectine ou ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule-1*), causant une diminution de l'accumulation de neutrophiles, mais aussi de l'hémorragie intra médullaire et de la dysfonction locomotrice encourue dans un modèle de compression de la moelle chez le rat (Hamada et al., 1996, Taoka and Okajima, 2000). Des études basés sur un modèle similaire et impliquant un anti-CD11d ont aussi permis d'affirmer le rôle important des PMN dans le stress oxydatif et les dommages secondaire post-TM (Bao et al., 2005, Bao et al., 2004). Concernant les monocytes/macrophages, l'administration d'un antagoniste peptidique à large spectre des récepteurs de chémokines, le vMIP2, a permis de confirmer leur importance dans leur recrutement en réduisant la gliose, la mort cellulaire à une semaine post-TM contusif, tout en préservant la matière blanche dans les faisceaux ventraux et dorsaux (Ghirnikar et al., 2000, Ghirnikar et al., 2001). Le caractère bénéfique de

l'atténuation du recrutement des phagocytes a aussi été établi par d'autres dans le contexte de l'ischémie médullaire et il est rapporté que les macrophages accompliraient leur action cytotoxique, du moins en partie, par la relâche excitotoxique de glutamate (Giulian and Robertson, 1990, Piani et al., 1991). Cependant, les macrophages joueraient aussi un rôle bénéfique dans la récupération locomotrice en relâchant du TGF- β (*Tumor Growth Factor- β*) et en phagocytant les débris myéliques (Mauter et al., 2000).

Cette description, quoique sommaire, des divers acteurs impliqués dans le processus inflammatoire, ainsi que de leur contribution dans la mort cellulaire secondaire permet d'apprécier leur complexité, leur interdépendance ainsi que le rôle prédominant joué par l'inflammation dans les dommages secondaires.

Cicatrice gliale et régénération axonale

L'épisode succédant aux dommages secondaires est caractérisé par l'infiltration de macrophages, de fibroblastes et de cellules méningéales ainsi que par l'activation des astrocytes et de la microglie (Kwon et al., 2002). Le site traumatique est marqué par une cavitation, la formation d'une cicatrice gliale et la présence de fibres démyélinisées parsemées, surtout en périphérie, par des fibres saines (Kwon et al., 2002).

En plus des pertes primaires et secondaires, cet environnement post-traumatique tardif se montre réfractaire à la croissance de nouvelles fibres axonales. L'étude de ces influences inhibitrices sur la croissance axonale est relativement récente mais a déjà permis l'élaboration de quelques stratégies thérapeutiques (Kwon et al., 2002, David and Lacroix, 2003, Mueller et al., 2005, McKerracher and Higuchi, 2006, Baptiste and Fehlings, 2006, Onose et al., 2009).

L'inhibition de la régénération axonale peut provenir de la myéline, disséminée dans le milieu extracellulaire suivant le traumatisme, ou des composantes de la cicatrices gliales produites, entre autres, par les astrocytes en gliose et se traduit par « l'effondrement du cône de croissance neuronal, la formation du bulbe de rétraction et le retrait du neurite » (David and Lacroix, 2003, Mueller et al., 2005).

Inhibition myélique

La myéline entourant les axones est composée de lipides et de protéines et, en plus de jouer un rôle primordial dans la conduction du potentiel d'action neuronal, joue un rôle physiologique inhibiteur sur la croissance des axones. En effet, ceci assurerait, en temps normal, un maintien parallèle des fibres axonales dans la moelle épinière, mais ce mécanisme se dévoile à double tranchant lors d'un traumatisme en avortant la repousse potentiellement bénéfique des axones (Pettigrew and Crutcher, 2001). Parmi les protéines inhibitrices les mieux décrites présentes dans la myéline, on compte Nogo-A, la *Myelin-Associated Glycoprotein* (MAG) ainsi que l'*Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein* (OMgp).

Des trois formes de Nogo, c'est Nogo-A qui retient le plus l'attention dans l'inhibition de la croissance neuronale. Cette protéine transmembranaire possède deux domaines inhibiteurs; l'un, Nogo-66, est soluble et agit à travers le récepteur Nogo (NgR) en interagissant avec le récepteur p75^{NTR} tandis que l'autre, Amino-Nogo, serait restreint à la membrane et nécessiterait une dimérisation afin d'accomplir son action inhibitrice (David and Lacroix, 2003). Étant donné le pouvoir inhibiteur et la topologie intracellulaire de ce second domaine (topologie incertaine dans la littérature), ainsi que la présence marquée de Nogo dans le réticulum endoplasmique, plusieurs suspectent que cette protéine n'accomplisse entièrement son rôle inhibiteur qu'en situation traumatique (Filbin, 2003).

MAG est une immunoglobuline représentant 1% des protéines de la myéline qui peut être relâchée par protéolyse pour potentiellement agir sur le Ganglioside GT_{1b} et le NgR₂, mais également sur le NgR/p75^{NTR} (David and Lacroix, 2003, Yiu and He, 2006). Il interagit aussi avec l'acide sialique, interaction postulée comme étant potentiatrice (Filbin, 2003).

Finalement, l'OMgp, tout comme le NgR, est une glycoprotéine ancrée à la membrane par le glycosylphosphatidylinositol (GPI) agissant également sur le NgR/p75^{NTR}. Ce dernier se montre d'une grande importance puisque les neurites des animaux p75^{-/-} semblent insensibles à l'inhibition myélique (David and Lacroix, 2003).

Les trois inhibiteurs associés à la myéline ont tous, mais pas exclusivement, comme intermédiaire signalétique le récepteur NgR₁. Ce dernier nécessite, comme déjà mentionné, une interaction avec le récepteur de la neurotrophine p75, membre de la famille du récepteur TNF- α , ou plutôt, selon une source plus récente, avec un autre membre de cette famille, la protéine TROY, en raison de son ubiquité dans le SNC, caractéristique qui n'est pas partagée par p75 (Yiu and He, 2006). Notons que, ces trois protéines membranaires se retrouvent aussi, en plus de chez la myéline juxta-axonale (et extérieure pour Nogo-A, surtout paranodale pour MAG et OMgp), à la surface des oligodendrocytes (David and Lacroix, 2003). Finalement, plusieurs autres composantes de la myéline impliquées dans l'inhibition de la croissance axonale restent encore à identifier ou dont la fonction reste à caractériser, parmi ceux-ci, on compte l'arretine (Kwon et al., 2002), l'ephrine B3 et Sema 4D (Yiu and He, 2006).

Cicatrice gliale

Peu après la phase inflammatoire aiguë, plusieurs médiateurs inflammatoires, dont TNF- α , l'endotheline-1, l'IL-1 β , l'IL-6, la thrombine et le CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*), activent les astrocytes résidents et déclenchent l'astrogliose (Fitch and Silver, 2008). Ce processus est marqué par une augmentation de l'expression de la protéine structurale GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) par les astrocytes, leur migration au site de traumatique, suivie d'une interdigitation formant une barrière cellulaire, dans les 3-5 jours post-TM, et la production de matrice extracellulaire (McGraw et al., 2001). Notamment, on assiste à la production astrocytique de tenascine, et de protéines « *slit* », mais aussi de semaphorine 3, d'ephrine-B2 et surtout de chondroïtine sulfates, tels le phosphacan, le brevican, le versican et le neurocan, dont l'effet inhibiteur sur la croissance des neurites est clairement décrit (Fitch and Silver, 2008, Sandvig et al., 2004). Ces derniers sont également produits par la microglie activée et les macrophages en réponse à divers médiateurs solubles de l'inflammation (Fitch and Silver, 2008).

Effecteurs intracellulaires

Les éléments inhibiteurs de la myéline décrits (Nogo-A, MAG, OMgp), de même que plusieurs des constituants de la matrice gliale (semaphorine 3, ephrin-B2, chondroïtines sulfates) contribuent à l'inhibition de la croissance neuronale en activant la petite protéine G RhoA (*Ras homolog gene family, member A*). Celle-ci a pour cible, entre autres, la sérine/thréonine kinase ROCKII (*Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase*) en s'associant sous sa forme GTP (Guanosine triphosphate), au domaine RBD (*Rho Binding Domain*) de ROCKII, ce qui entraîne un changement de conformation lui conférant une activité catalytique. Cette isoforme de cette kinase, retrouvée principalement dans le système nerveux, agit sur différentes cibles, telles CRMP2 (*Collapsin Response Mediator Protein-2*), LIMK (*LIM Kinase*), MLC (*Myosin Light Chain*), Slingshot phosphatase et MLCP (*Myosin Light Chain Phosphatase*), impliquées dans le maintien du cône de croissance et la régulation du cytosquelette d'actine, ce qui engendre l'effondrement et le retrait du cône de croissance neuronale (Mueller et al., 2005, Yiu and He, 2006).

Apoptose comme dommage secondaire post-TM

Les dommages secondaires suivant un TM se traduisent ultimement par la mort de plusieurs cellules gliales et neuronales quelque temps après la lésion initiale. Quoiqu'une proportion de cette mort cellulaire soit nécrotique, une part non négligeable serait cependant de nature apoptotique. L'apoptose définit le processus physiologique responsable de l'organisation et de l'exécution de la mort cellulaire et est impliquée dans certains contextes normaux, tels le développement embryonnaire, l'homéostasie du système immunitaire (production lymphocytaire, protection virale) ou pathologiques, en réponse à un endommagement cellulaire irréversible, par exemple. Pour cette raison, ce phénomène est souvent qualifié de « mort cellulaire programmée » ou de « suicide cellulaire » et fait contraste avec la mort dite nécrotique. En effet, contrairement à cette dernière, l'apoptose nécessite la mobilisation de ressources énergétiques, la production de certaines protéines et l'enclenchement d'une cascade protéique, jouant un rôle tant intégrateur qu'exécuteur, et qui culmine en la destruction organisée de la cellule. Cette destruction est caractérisée sommairement par un clivage de l'ADN, une condensation de la chromatine, puis de la cellule elle-même alors qu'elle se désagrège par bourgeonnement membranaire en corps apoptotiques. Autre divergence envers la mort cellulaire nécrotique, l'apoptose ne soulève pas de réponse inflammatoire, quoique les corps apoptotiques produits soient éliminés par phagocytose (Charriaut-Marlangue, 2004).

Signalisation intracellulaire de l'apoptose

Tout d'abord, il est pertinent de décrire brièvement les protagonistes moléculaires de l'apoptose ainsi que leur fonction dans la cascade apoptotique. Mais avant, rappelons que l'apoptose peut être d'origine intrinsèque ou extrinsèque, selon la nature du stimulus. Le stress oxydatif, l'entrée massive de calcium/dépolarisation de la mitochondrie, l'ischémie et les mutations au matériel génétique sont généralement considérés comme étant des stimuli à l'origine de l'apoptose intrinsèque, ou mitochondrie-dépendante (Loh et al., 2006). Et

pour cause, l'enclenchement de la cascade apoptotique est tributaire de la relâche de facteurs pro-apoptotiques présent dans l'espace intermembranaire mitochondrial, notamment le Cytochrome c, Smac (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*)/DIABLO (*Direct IAP-Associated Binding protein with Low PI*), Endo G (Endonucléase G), AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) et HtrA₂ (*High Temperature Requirement protein A₂*) (Polster and Fiskum, 2004). Le premier, lorsque relâché, s'associe à Apaf-1 (*Apoptosis Protease Activating Factor-1*) et à la pro-caspase-9 pour former l'apoptosome, activer par clivage la caspase-9, qui à son tour active les caspases-3 et -7 (Loh et al., 2006). Smac/DIABLO et HtrA₂, quant à eux, agissent directement auprès de la pro-caspase-3, en la libérant de son interaction protectrice avec XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), membre de la famille des IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*), et permet son activation par la caspase-9 (Polster and Fiskum, 2004). Notons que les caspases-3 -6 et -7, ont plus d'une centaine de cibles protéiques connues, impliquées, entre autres, dans la structure et la signalisation cellulaire, la transcription/traduction et la réparation nucléaire (Kohler et al., 2002). Plus précisément, la caspase-3 serait, selon certains, essentielle à la fragmentation nucléaire, la condensation de la chromatine et le bourgeonnement de la membrane plasmique et possède la capacité d'activer la caspase-9, instaurant ainsi une boucle de rétroaction positive (Kohler et al., 2002, Polster and Fiskum, 2004).

La stabilité de la membrane mitochondriale est donc primordiale dans l'initiation de l'apoptose et plusieurs protéines sont impliquées dans sa régulation, plus particulièrement en ce qui concerne le mPTP (*Mitochondrial Permeability Transition Pore*). À la membrane mitochondriale externe, on retrouve Bcl₂ (*B-Cell Lymphoma 2*), mais aussi Bcl-x_L (*B-Cell Lymphoma-X-large*) et Bcl-w, qui a pour effet d'inhiber la formation du mPTP. Par contre, la protéine Bax (*Bcl₂-Associated X protein*), mais également Bid (*BH3 Interacting Domain death agonist*), Bak (*Bcl₂-Antagonist/Killer 1*) ou Bad (*Bcl₂-Associated Death promoter*), promeut la formation du mPTP et est antagonisée par Bcl₂ (Loh et al., 2006). Ainsi, la dualité entourant la régulation du mPTP est au centre d'une multitude de voies de

signalisation qui seront discutées davantage. Bad agit en inhibant Bcl-x_L au niveau de la membrane externe mitochondriale et est lui-même inhibée par différentes voies, dont PKA (Protéine Kinase A) et PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), impliquées dans la transduction des signaux des récepteurs de facteurs de croissance et de survie cellulaire et ainsi que de certaines cytokines (Culmsee and Mattson, 2005, Jiang et al., 2007). Bax voit sa translocation mitochondriale augmentée par voies exogènes, JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) ou p38MAPK (*p38 Mitogen-Activated Protein Kinase*), ou endogène, conséquence de l'endommagement nucléaire (mutation, etc.), de façon p53-dépendante (Tsuruta et al., 2004, Cheung and Slack, 2004, Culmsee and Mattson, 2005), tandis que l'action de Bcl₂ se voit directement inhibée par les protéines Puma ou Noxa, toutes deux p53-dépendantes, ou indirectement, *via* leur interaction avec Bax, par Bim (*Bcl₂-Interacting Mediator of cell death*) et DP5 (*Death Protein 5*) (JNK- et *Mixed-Lineage Kinase*-dépendants) (Culmsee and Mattson, 2005, Kirkland and Franklin, 2003, Franklin, 2003).

Outre la voie mitochondrie-dépendante qui vient d'être très sommairement décrite, la cellule peut également succomber par une apoptose extrinsèque, qui découle de l'activation de « récepteurs de mort », dont Fas (*Apoptosis Stimulating Fragment*), p75^{NTR} et le récepteur TNF- α , par leurs ligands respectifs (Nagata, 1997). Ces récepteurs ont en commun un domaine FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) qui entraîne l'activation des caspase-8 et caspase-10. Ces caspases peuvent alors activer les caspases effectrices -3 et -7 et même influencer la balance apoptotique mitochondriale en activant Bid. Cette protéine jouerait donc un rôle d'intermédiaire entre les deux voies, et possède un rôle pro-apoptotique en favorisant Bax et Bak et inhibant Bcl-x_L à la membrane externe de la mitochondrie (Polster and Fiskum, 2004, Loh et al., 2006).

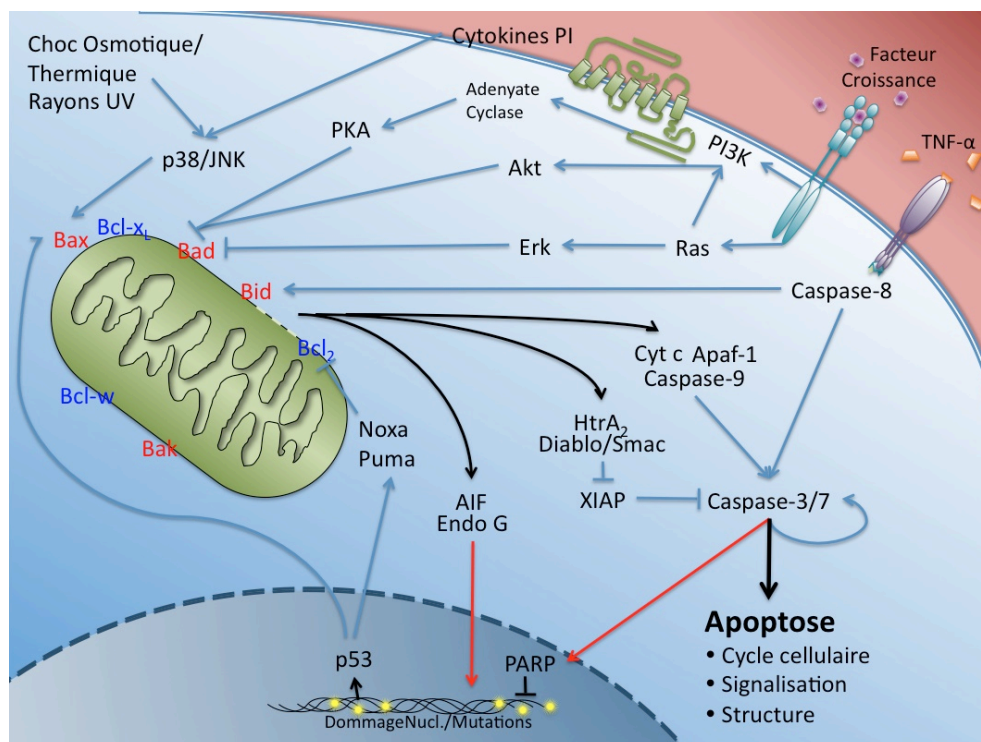


Figure 1.1 Représentation schématique sommaire des relations entre les principaux intermédiaires régissant le processus apoptotique.

Tel que brièvement mentionné, la voie PI3K exerce un pouvoir anti-apoptotique dans plusieurs contextes, en activant Akt (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*). Cette kinase, tout comme PKA, phosphoryle alors Bad en sérine 136, ce qui favorise son interaction avec la protéine 14-3-3, prévient son association à Bcl-XL (Harada et al., 1999, Datta et al., 1997, Datta et al., 1999) et est reconnu comme pouvant phosphoryler la pro-caspase-9 (Cardone et al., 1998). La voie ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) présente aussi une action anti-apoptotique, face au stress oxydatif ainsi qu'au retrait des facteurs trophiques chez la lignée neuronale PC12 (Jiang et al., 2005), mais serait impliquée dans l'accomplissement de l'apoptose causée pas le retrait potassique (Cheung and Slack, 2004). Cette kinase fait partie de la famille des MAPK et tout comme Akt, elle accomplit son action en phosphorylant la pro-caspase-9 (Cheung and Slack, 2004) mais également en phosphorylant Bad par l'intermédiaire de p90RSK (*p90 Ribosomal S6 Kinase*) (Roux et al., 2003).

L'apoptose dans le traumatisme médullaire

Une des premières observations de l'apoptose dans la moelle épinière suivant un traumatisme médullaire fut effectuée au milieu des années '90. En effet, il semblerait que ces observations aient été initialement présentées dans un résumé de la *Society for Neuroscience* (Crowe et al., 1995). L'année suivante, Li *et al.* et Katoh *et al.* rapportent tous deux, respectivement par TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transférase dUTP nick end labelling*) et électrophorèse, la présence de cellules apoptotiques dans la moelle épinière de rat post-trauma au site de l'insulte compressive durant les premiers jours suivant la lésion (Li *et al.*: 4-9 d; Katoh *et al.*: 12 h-8 d), et Li *et al.* suspecte la nature oligodendrocytique de ces cellules (Li *et al.*, 1996, Katoh *et al.*, 1996). Crowe *et al.* note également la présence, en plus de la nécrose, de cellules apoptotiques à 6 h, atteignant un maximum à 8 jours, mais qui se maintiendrait jusqu'à 3 semaines, à proximité du site de la lésion contusive chez le rat ainsi que chez le singe (Crowe et al., 1997). La distribution apoptotique précoce est décrite comme initialement restreinte au site contusif et évoluant de façon rostro-caudale après quelques jours (8-21 d). De plus, cette équipe remarqua, tout comme Li *et al.*, les caractéristiques d'oligodendrocytes, puis microgliales, des cellules apoptotiques et dont la cinétique spatio-temporelle par rapport à l'apoptose neuronale, supportent un rapport de causalité entre la mort des neurones et celle des cellules gliales (Crowe et al., 1997, Bresnahan et al., 1996, Li et al., 1996, Shuman et al., 1997, Beattie et al., 1998).

Parallèlement, Liu *et al.* observa par TUNEL la présence de neurones apoptotiques chez le rat au site de la lésion entre 4 et 24 h post-trauma, avec un maximum à 8 h au site de la lésion. L'apoptose gliale, quant à elle, semblait se dérouler de manière différente, avec une présence entre 4 h et 2 semaines, atteignant un maximum à 24 h, et dont la distribution évoluait du site contusif pour ensuite se distribuer dans la matière blanche environnante (Liu et al., 1997). Cette cinétique, rappelant celle observée par Crowe *et al.* et Shuman *et al.*, permet donc de distinguer deux « vagues » d'apoptose, la première affectant de façon précoce et indiscriminée les cellules gliales et neuronales situées au site lésionnel durant les

premières heures suivant la lésion, la deuxième affectant plutôt les oligodendrocytes et la microglie une à trois semaines suivant l'insulte et se propageant du site traumatique aux fuseaux rostro-caudaux de la matière blanche (Liu et al., 1997). Notons cependant que la nature neuronale des cellules apoptotiques précoce ne semble pas être appuyées par les travaux de Casha *et al.* (Casha et al., 2001). Néanmoins, la distinction entre ces deux événements suggère que celle-ci se reflète également dans les mécanismes pathophysiologiques impliqués et seule l'apoptose précoce sera dorénavant sujet à discussion dans le cadre de ce mémoire puisque la caractérisation expérimentale de l'apoptose s'est faite à 4 h post-TM exclusivement. Mentionnons seulement que l'apoptose tardive affecterait principalement les oligodendrocytes, directement par perte de support trophique lors de la dégénération Wallerienne des neurones auxquels ils sont associés (Abe et al., 1999), ou alors indirectement par « exécution » TNF- α -dépendante et leur phagocytose par la microglie activée par cette dégénération neuronale post-TM (Shuman et al., 1997). Concernant cette deuxième voie, Shuman *et al.* évoque cependant la possibilité qu'il puisse aussi s'agir d'apoptose microgliale. Cependant, comme précisé par Park *et al.*, le lien causal entre la dégénération axonale et l'apoptose des oligodendrocytes, ainsi que son sens, demeure sous investigation (Park et al., 2004) et, selon lui, l'apoptose des oligodendrocytes découlerait d'une excitotoxicité glutamate-dépendante impliquant les astrocytes, mais aussi les cellules inflammatoires, *via* le TNF- α ou le NGF (*Nerve Growth Factor*) (Park et al., 2004).

Apoptose précoce

Quoique qu'une proportion importante de la mort cellulaire précoce soit attribuable à la nécrose (Lee et al., 2000a, Liu et al., 1997), une fraction d'entre elle présente tout de même des caractéristiques apoptotiques dans les premières heures post-TM.

Peu après la publication de Liu *et al.*, décrivant la présence de cellules TUNEL positives de 4 à 24 h post trauma chez le rat, une étude en milieu clinique notât la présence de cellules apoptotiques chez l'humain 3 h post-TM (Emery et al., 1998). Lou *et al.* remarque

également la présence de cellules TUNEL positives chez le rat, mais seulement à 4 et 8 h post-TM (pas 30 min, 12 ou 24 h) (Lou et al., 1998). Étrangement, Li *et al.* 1996 et 1999 n'observent pas d'apoptose à 4 ou 24 h dans ce modèle, possiblement en raison de la nature compressive et non contusive de l'insulte (Li et al., 1996, Li et al., 1999). Nakahara *et al.* témoigne aussi de la présence de cellules TUNEL positives à 6 h chez le rat, se poursuivant jusqu'à une semaine (max 3 d) (Nakahara et al., 1999).

Springer *et al.* 1999 et 2000, quant à eux, rapportent la présence d'apoptose précoce en mesurant une augmentation significative de l'activité de la caspase-3 d'une à 24 h, en atteignant un maximum à 4 h (30 min NS), tandis qu'il remarque une augmentation de la relâche du Cytochrome c et de l'activation de la caspase-9, étudiée par Western blot, dès la première heure chez le rat (Springer et al., 1999, Springer et al., 2000).

Après avoir étudié par TUNEL des coupes de moelles compressées, Wada *et al.* n'observe qu'à 12 h (pas à 6 h, mais présent aussi à 24 h, 3, 7 et 14 d) une augmentation du nombre de cellules apoptotiques au site lésionnel (Wada et al., 1999), contrairement à Lee *et al.* qui note quelques cellules TUNEL positives, neuronales et gliales, à 4 h post-TM, dans la matière grise du site de la lésion (16 h, max 24-48 h) (Lee et al., 2000a). En ce qui a trait aux travaux de Citron *et al.*, ils remarquent chez le rat une augmentation des cellules apoptotiques à 8 h, avec un maximum à 24 h, persistant jusqu'à 2 semaines à l'épicentre de la lésion (Citron et al., 2000). De plus, selon eux, l'expression de la caspase-3 serait induite au cours des 4 à 8 premières heures et activée dans les premières 24 h (Citron et al., 2000).

La présence d'apoptose précoce fut de nouveau rapportée en 2000 par Li *et al.*, qui constate un signal TUNEL positif dans la moelle, appuyé par une coloration de Hoescht 33342, dès 8 h ainsi qu'à 24 et 48 h, à des distances croissantes du point d'impact (Li et al., 2000). Il confirme également l'activation de la caspase-3, ainsi que de la caspase-1 à 24 h post-TM au site lésionnel chez le rat (Li et al., 2000).

Keane *et al.* a contribué à la caractérisation de l'apoptose post-TM, en se penchant sur la caspase-8 et -9, dont il rapporte la présence par immunohistochimie, de 6 h à 3 jours post-TM dans la matière grise et blanche de rat (Keane et al., 2001). Cette activation de la

caspase-8, ainsi que de la caspase-3, dans la moelle fut aussi confirmée à 24 h chez le rat (aussi 48 h, 7 et 14 d) par Satake *et al.*, qui observa aussi la présence de cellules TUNEL positives dès 6 h, jusqu'à 3 jours au site de la lésion (Satake et al., 2000), similairement à Casha *et al.*, qui remarqua aussi leur présence de 6 h à 2 semaines, en plus d'une activation des caspases-3 et -8 (Casha et al., 2001). Cependant, contrairement à ces derniers, Nesic *et al.* n'observa pas d'apoptose à 6 h, mais plutôt à 24 h post-TM contusif (Nesic et al., 2001).

Deux ans plus tard, Yune *et al.*, remarqua à son tour des cellules TUNEL positives à 4 h, tout en admettant une présence plus marquée à 24-48 h, dans un modèle de *crushing* de la moelle (Yune et al., 2003) puis l'équipe de Yin *et al.* observa en 2005, par Western blot, une activation de la caspase-3 à 4 h post-TM ainsi qu'une induction de DP5 (HRK, Harakiri) après 1 h, tous chez le rat (Yin et al., 2005).

Aussi en 2005, McEwen et Springer dresse la distribution spatio-temporelle de l'activation de la caspase-3 suivant un TM contusif en relation aux types cellulaires chez cet animal. Cette publication, qui confirme la présence d'une dichotomie temporelle dans l'apoptose post-TM, rappelle la résistance que présentent les astrocytes à celle-ci et constate aussi une activation de la caspase-3 dès 4 h, particulièrement chez les neurones, les oligodendrocytes et la microglie (McEwen and Springer, 2005). Finalement, en addition à l'activation de la caspase-3 décrite plus tôt, Ahn *et al.* rapporte en 2006 son activation dès 6 h jusqu'à 48 h et note également une immunoreactivité accrue et précoce (moins de 12 h) pour le cytochrome c, PARP, tout deux impliqués dans le processus apoptotique (Ahn et al., 2006).

Liu *et al.* décrit l'environnement lésionnel immédiat (3-5 min) suivant une insulte contusive de la moelle comme étant caractérisé par un certain nombre de petichia micro-hémorragiques découlant de la rupture vasculaire, suivit par un œdème, au cours des heures suivantes (Liu et al., 1997). Comme discuté plus tôt, dès les premières minutes suivant un traumatisme médullaire, on assiste au développement d'une réponse inflammatoire marquée notamment par une augmentation du stress oxydant, endogène ou exogène, par

une augmentation des acides aminés excitateurs (AAE), combinée à une augmentation de certaines cytokines dites « pro-inflammatoires ».

Ces trois éléments, faisant partie de la réponse inflammatoire organisée par l'organisme en réponse au traumatisme mécanique, figurent probablement parmi les éléments les plus susceptibles d'être à l'origine de l'apoptose précoce, et seront donc discutés davantage.

Cytokines pro-inflammatoires dans l'apoptose précoce post-TM

Selon Beattie *et al.*, certaines cytokines (IL-1 β , TNF- α) relâchées par la microglie pourraient constituer un médiateur de l'apoptose neuronale et gliale (Beattie *et al.*, 2000). Concernant TNF- α , il appuie cette hypothèse, notamment, sur le potentiel apoptotique qu'a le TNF- α sur les oligodendrocytes (D'Souza *et al.*, 1995), sur son induction aiguë post-TM (Wang *et al.*, 1996, Bethea *et al.*, 1998, Xu *et al.*, 1998, Bartholdi and Schwab, 1997, Yakovlev and Faden, 1994), ainsi que sa perméabilité à travers la barrière hémato-médullaire (Pan *et al.*, 1999, Pan *et al.*, 2003).

La cinétique de production locale de TNF- α suivant une lésion de la moelle est décrite comme étant de nature aiguë. En effet, celle-ci fut décrite, selon Wang *et al.* puis par Lee *et al.*, comme augmentant soudainement (après 1 h) et maintenant un plateau, jusqu'à leur chute, environ 3 jours post-TM (Wang *et al.*, 1996, Lee *et al.*, 2000a, Lee *et al.*, 2000b) ou serait, selon Bartholdi *et al.*, dérégulé après quelques heures (6 h) (Bartholdi and Schwab, 1997). Étrangement, Xu *et al.* rapporte une augmentation plus lente, mais qui ne se maintient pas non plus au delà de trois jours, tandis que Lee *et al.* observe toujours, mais faiblement, le TNF- α après une semaine (Lee *et al.*, 2000a).

En plus de son induction par le traumatisme, une étude mit en évidence l'importance du TNF- α dans l'apoptose médullaire par l'utilisation d'anticorps neutralisant contre cette cytokine (Lee *et al.*, 2000a). Ce traitement se traduit par une diminution de l'apoptose et diminue la production de NO , lui-même responsable d'une fraction de l'apoptose TNF- α -dépendante, probablement *via* le stress oxydatif, démontrant l'implication de ce dernier dans l'apoptose précoce.

Également, le rôle de TNF- α dans l'apoptose suivant l'insulte initiale peut aussi s'appuyer sur les résultats de marquages immunohistochimiques de la caspase-8 de Keane *et al.* (Keane et al., 2001). La caspase-8 étant généralement activée suivant la stimulation des récepteurs de mort (TNFR, Fas, etc.), voie qualifiée d'extrinsèque, sa détection à 6 h dans les neurones de la matière grise (faiblement dans la matière blanche) ainsi qu'à 24 h dans la matière blanche (faiblement dans la matière grise), et se poursuivant jusqu'à 3 jour suggère fortement une apoptose TNF- α -dépendante (Keane et al., 2001, Keane et al., 2006).

Cependant, contrairement au rôle pro-apoptotique souvent associé aux TNFR, une étude montra, par *knock-out*, un rôle anti-apoptotique de ces récepteurs, contestant la contribution directe du TNF- α dans l'apoptose post-TM. En effet, le *knock-out* du TNFR2 ou 1 n'avait aucun impact sur, ou exacerbait, la taille de la lésion médullaire contusive, respectivement, et tout deux réduisaient la récupération locomotrice, lorsque comparés au contrôle *wild type*. Les auteurs de cette étude proposent que la mutation du TNFR1 accentue l'apoptose par une diminution NF-kB-dépendante de l'expression de la protéine anti-apoptotique c-IAP2 (Kim et al., 2001).

Finalement, on attribue à TNF- α un puissant pouvoir chemoattractant, agissant, notamment, sur les neutrophiles (Lu et al., 2000), eux-mêmes producteurs de TNF- α , en stimulant l'expression endothéliale de la E-selectine (Taoka and Okajima, 2000). Ceux-ci peuvent aussi contribuer au stress oxydatif *via* les enzymes NADPH oxydase/myéloperoxydase (MPO) (Bao et al., 2005) et causer des dommages par la sécrétion de protéases (Taoka and Okajima, 2000), telles l'élastase et la MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase*), toutes deux démontrées comme étant impliquées dans les dommages secondaires post-TM (Taoka et al., 1998, Tonai et al., 2001, Noble et al., 2002).

La cytokine pro-inflammatoire IL-1 β suscite également l'intérêt en raison de sa surexpression aiguë au site de la lésion, initialement par les cellules locales (microglie : 1 h) puis par les cellules périphériques (PMN : 6-12-24 h) (Bartholdi and Schwab, 1997), mais également par son effet sur la survie cellulaire *in vitro* (Merrill, 1991, D'Souza et al., 1995). L'évidence la plus convaincante d'un rôle de cette cytokine dans l'apoptose post-TM est

fournie par l'inhibition du récepteur à l'IL-1 β dans un modèle de contusion médullaire et l'observation de la diminution de l'activité de la caspase-3 qui en résulte à 72 h (Nesic et al., 2001). Malheureusement, aucun temps expérimentaux précoces ne furent rapportés dans cette étude et on ne peut que supposer une action similaire à 4 h post-TM.

L'IL-6, souvent considérée comme pro-inflammatoire, n'est pas détectée par Bartholdi, 1997, sauf de façon négligeable à 3-6 h du côté ventral, opposé à la lésion (Bartholdi and Schwab, 1997) mais est rapportée comme étant exprimée à 6 h (Ahn et al., 2006) ainsi qu'à 4 h (Byrnes et al., 2006). En raison de son expression plus tardive, il est improbable qu'elle occupe un rôle d'importance dans l'initiation ou l'accomplissement de l'apoptose précoce détectée expérimentalement à 4 h dans le présent projet de recherche, et ne sera donc pas discuté davantage.

Stress oxydatif dans l'apoptose précoce post-TM

Plusieurs acteurs de la balance oxydante semblent être impliqués dans l'évolution des dommages secondaires, notamment dans l'apoptose (Buttke and Sandstrom, 1994), suivant le traumatisme médullaire. Les ROS peuvent agir directement pour induire l'apoptose, en endommageant l'ADN ou par transcription de « gènes de mort » NF- κ B-dépendante (Buttke and Sandstrom, 1994). Finalement, il faut garder à l'esprit que le stress oxydant est également responsable de la mort par nécrose, lorsque trop important, et que l'apoptose, processus actif, découle d'une exposition plus modeste à ce stress (Bonfoco et al., 1995). Les évidences impliquant les différentes espèces réactives de l'oxygène dans l'apoptose précoce post-TM seront donc investiguées davantage.

Tout d'abord, la production de superoxyde a été étudiée expérimentalement suivant un traumatisme contusif de la moelle épinière et a permis d'observer son augmentation immédiate et considérable, qui se prolongeait pendant 10-12 h *in vivo* (Liu et al., 1998). Dans la pathophysiologie du traumatisme médullaire, l'anion superoxyde peut être produit par l'enzyme NADPH oxydase. Cette enzyme présente à la membrane cellulaire de plusieurs types cellulaires ainsi que dans le phagosome des phagocytes, des neutrophiles

notamment, génère du superoxyde en présence d'oxygène, qui est par la suite réduit en H_2O_2 ou en peroxydinitrite (Liu et al., 1998). Le type membranaire de cette enzyme est reconnu comme étant inductible lors de la reperfusion, et serait donc plus pertinent d'en discuter dans un contexte de lésion ischémique ou compressive de la moelle (Hong et al., 2006). Cependant, les leucocytes demeurent une source non-négligeable de radicaux libres qui, selon certaines évidences, contribuerait à l'apoptose post-TM. En effet, l'inhibition de l'activation/migration neutrophilaire par l'usage d'anticorps anti-CD11d, unité alpha de l'intégrine CD11/CD18, diminue l'expression de la sous-unité gp91^{phox} de la NADPH oxydase, la production de superoxyde, ainsi que l'activation de la caspase-3 à 6 h post-TM (Bao et al., 2005). Un tel traitement réduit aussi l'oxydation de l'ADN post-TM (ainsi que des protéines) (Bao et al., 2004), ce qui permet d'émettre l'hypothèse que l'apoptose précoce induite par les PMN emprunte la voie intrinsèque, au moins partiellement.

Une autre démonstration convaincante du rôle de l'anion superoxyde dans l'apoptose précoce fut récemment offerte par un article montrant que l'administration systémique de PEP-1-SOD1, superoxyde dismutase-1 couplée à un domaine de transduction protéique, réduisait l'apoptose à 4 h post-TM, documentée par une diminution de l'activation de la caspase-3 ainsi que de la fragmentation nucléaire évaluée par électrophorèse et le nombre de cellules TUNEL et NeuN (*Neuronal Nuclei*) positives (Yune et al., 2008).

Malheureusement, il n'existe aucune autre littérature, à notre connaissance, traitant de l'influence du superoxyde sur l'apoptose à des temps précoces suivant une insulte contusive de la moelle.

Une étude par microdialyse *in vivo* de la production de H_2O_2 intra médullaire induite par un traumatisme contusif (75 g·cm) a permis d'observer une augmentation soudaine (30 min), mais relativement faible (1.3 fois) de sa concentration extracellulaire et qui se maintenait de façon constante pendant 11 h (Liu et al., 1999a). Cette cinétique, similaire à celle de l'ion superoxyde, suggéra à cet auteur que la production de peroxyde post-TM était le résultat de la réaction du O_2^- avec l'eau. La demi-vie remarquablement courte du superoxyde, la faible augmentation du H_2O_2 (Liu et al., 1999a) et sa neurotoxicité atténuée par absence de

Fe^{2+} (Liu et al., 1994), portent à croire que ces deux composés ne soient que des intermédiaires menant à la production de l'ion hydroxyle et qu'il ne contribuent pas directement aux dommages cellulaires (Liu et al., 1999a). Finalement, le H_2O_2 semblerait induire l'expression de CD95L, chez des cultures de microglie, dès 4 h d'exposition et pourrait contribuer à l'apoptose précoce par cette voie (Vogt et al., 1998). Cependant, les concentrations employées dans cette étude (62 et 125 μM) sont considérablement supérieures à la concentration observée *in vivo* (environ 0.9 μM) par Liu, *et al.* 1999, mitigeant ainsi un potentiel rôle physiologique (Liu et al., 1999a, Vogt et al., 1998).

L'ion hydroxyle produit par dégradation du H_2O_2 a été démontré comme pouvant bloquer la conduction électrique (3-5 h), lorsque généré *in vivo* par microdialyse, entraîner une mort neuronale accrue ainsi que la relâche de certains acides aminés, dont le glutamate, la taurine, l'alanine, et aussi de GABA (Liu et al., 1994). L'implication des radicaux libres dans l'induction de l'apoptose neuronale (20 h) suivant le TM fut démontrée de façon convaincante *via* l'injection médullaire de H_2O_2 (concentration observée en TM) combiné à du Fe^{2+} . Cette insulte mène à la production *in vivo* d'ion hydroxyle et se traduit par une augmentation de la mort cellulaire, mais également du nombre de cellules TUNEL positives dans la moelle épinière (Bao and Liu, 2004). De plus, la réduction du potentiel oxydatif par l'emploi du MnTBAP (analogue de SOD) réduit l'apoptose évaluée par TUNEL (Bao and Liu, 2004).

Le 4-Hydroxynonenal est un autre médiateur important des dommages oxydatifs post-TM. Le HNE est le produit de l'hydroperoxydation des acides gras et est reconnu comme réagissant avec les résidus histidine, cystéine et lysine, altérant la conformation des protéines (Malecki et al., 2000) et peut être neutralisé par l'enzyme glutathion réductase (Kruman et al., 1997). *In vitro*, ce dérivé lipidique fut démontré comme étant médiateur de l'apoptose neuronale et gliale induite par le stress oxydatif chez des cultures médullaires primaires et une lignée cellulaire (Kruman et al., 1997, Malecki et al., 2000, Gard et al., 2001). De plus, *in vivo*, ce composé s'accumule dramatiquement peu de temps après le traumatisme médullaire (dès 1 h post-trauma) au site lésionnel, pour ensuite s'étendre au

delà du site traumatique et diminuerait significativement la récupération de glutamate (Springer et al., 1997, Xiong et al., 2007). Sa diminution au site lésionnelle par un traitement à l'anti-CD11d suggère que le stress oxydant d'origine leucocytaire participerait, entre autres, à sa formation (Bao et al., 2005). Finalement, le HNE fut aussi démontré comme pouvant inhiber l'enzyme Na^+/K^+ -ATPase (Siems et al., 1996), action permettant une contribution potentielle à l'entrée de calcium et à l'apoptose mitochondrie-dépendante. Également, l'oxyde nitrique peut être produit par les trois formes de la NOS (Xiong et al., 2007). Lors d'un traumatisme de la moelle épinière, on observe une augmentation virtuellement immédiate qui s'estompe dans les deux heures suivant le traumatisme de sa présence intramédullaire (Liu et al., 2000). Selon Liu, *et al.* 2000, cette augmentation de l'activité de la NOS pourrait être attribuable à une production neuronale induite par l'entrée de calcium glutamate-dépendante, ou à une production microgliale cytokine-dépendante (Liu et al., 2000). Cette deuxième affirmation peut être appuyée par la réduction observée *in vivo* de la production de $\cdot\text{NO}$ (4 h post-TM) suivant un traitement neutralisant $\text{TNF-}\alpha$ post-TM (Lee et al., 2000a, Yune et al., 2003). Également, le lien entre la production de $\cdot\text{NO}$ et l'apoptose fut mis en évidence par la réduction de près de 60% du nombre de cellules TUNEL+ par l'administration de L-NAME (*L-Nitro-Arginine Methyl Ester* : 2 jours post-TM) et de la fragmentation nucléaire par l'injection de S-methylisothiourée ou de carboxy-PTIO (24 h post-TM) (Satake et al., 2000, Yune et al., 2003). Malgré la nature plutôt tardive de ces observations par rapport temps expérimental concerné par ce mémoire, ces études semblent tout de même attribuer au $\cdot\text{NO}$ un potentiel pro-apoptotique, qui pourrait s'appliquer également à des temps plus précoces. Finalement, il faut mentionner les rôles, à la fois protecteur et toxique, que semblent jouer le $\cdot\text{NO}$ dans les traumatismes du SNC. En effet, certaines expériences supportent que le $\cdot\text{NO}$ d'origine endothéliale puisse être protecteur, tandis que celui induit par le TM, d'origine neuronale ou de la microglie/macrophages, serait néfaste (Liu et al., 2000). Quoi qu'il en soit, le $\cdot\text{NO}$ peut réagir avec l'ion superoxyde pour générer divers dérivés nitrés, pouvant contribuer au stress oxydatif, dont le peroxy-nitrite.

Espèce réactive de l'oxygène secondaire, le peroxy-nitrite augmente aussi (3.5 fois) suivant le TM, mais présente une cinétique plus lente (intermédiaire entre celle du superoxyde et du $\cdot\text{NO}$), atteignant un maximum à 40 min et diminuant pendant plus de trois heures (Liu et al., 2000). En raison de l'abolition de la production d' ONOO^- causée par l'ajout de SOD et de L-NAME, Liu *et al.* 2000 suggère que l' ONOO^- serait un produit secondaire, issu de la réaction entre le superoxyde et le $\cdot\text{NO}$ (Liu et al., 2000). Plusieurs études *in vitro* ont démontré le potentiel cytotoxique de l' ONOO^- et celui-ci s'accomplirait par trois mécanismes, résumé par Bao *et al.* : sa décomposition en OH^\bullet et l'ion nitronium (NO_2^+) l'oxydation des groupes sulfhydryles, des lipides, de l'ADN et des protéines ainsi que la nitration des résidus tyrosines et phénylalanines (Bao and Liu, 2002). Une revue par Leist, *et al.* 1998 suggère également que le ONOO^- puisse stimuler la relâche d'AAEs, plus particulièrement de glutamate, qui accentuerait une excitotoxicité NMDAR-dépendante post-synaptique pouvant amorcer une mort cellulaire par apoptose (Leist and Nicotera, 1998). À notre connaissance, il reste cependant à déterminer si ce mécanisme est impliqué dans l'induction de l'apoptose suivant le TM.

In vivo, la production exogène d' ONOO^- dans la moelle épinière entraîne une mort neuronale associée avec une perte des fonctions locomotrices normale (échelle Beattie, Basso, Bresnahan ou BBB), sans toutefois renseigner sur la nature de la mort cellulaire (apoptose vs nécrose) (Bao and Liu, 2002). Cette précision sera fournie par un article ultérieur confirmant, *in vivo*, le potentiel apoptotique et nécrotique des concentrations d' ONOO^- mesurées suivant une TM. Ces précisions proviennent du dosage de la caspase-3 ainsi que du décompte des cellules TUNEL+, combiné à une observation électromicroscopique. On rapporte une augmentation dès 6 h, au site lésé, du décompte apoptotique total et neuronal, qui s'étend aux régions environnantes et qui atteint un sommet à 24 h pour ensuite diminuer après 2 jours chez le rat (Bao and Liu, 2003). La présence de la caspase-3 se fait aussi marquante à 6 h, puis s'estompe (12 h non-significatif) (Bao and Liu, 2003). Ces résultats suggèrent donc que le stress oxydatif, plus

particulièrement *via* le ONOO⁻ participe à l'apoptose précoce, dommage secondaire observé suivant le TM.

Excitotoxicité dans l'apoptose précoce post-TM

Suivant un traumatisme de la moelle épinière, on assiste à l'augmentation de la concentration extracellulaire de plusieurs acides aminés dont certains, l'aspartate et le glutamate, sont excitateurs ou potentiateurs, comme la glycine (Ransom and Stec, 1988), en agissant sur les récepteurs NMDA, AMPA ou Kainate (Panter et al., 1990, Liu et al., 1991). L'augmentation de ces acides aminés se produit de façon soudaine (20 min), est influencée par la sévérité du traumatisme, atteint des concentrations neurotoxiques (Liu et al., 1999b, Leist and Nicotera, 1998) et s'estompe dans les 60 min post-TM (Panter et al., 1990). Panter *et al.* se base sur les travaux de Choi *et al.* 1987 et 1988 pour distinguer deux voies par lesquelles les AAEs entraînent la mort cellulaire : 1) débalancement ionique causant l'œdème cellulaire et 2) l'activation de protéases, dommages membranaires et *cross-linking* protéique en conséquence à l'entrée de calcium (Panter et al., 1990, Choi, 1987, Choi, 1988). Cependant, seule la deuxième voie n'est pertinente en ce qui a trait à l'apoptose et il fut proposé que l'apoptose par excitotoxicité soit intimement lié à la fonction mitochondriale (Ankarcrona et al., 1995).

In vitro, il fut démontré que les neurones spinaux montraient une vulnérabilité réduite face à une stimulation du NMDAR et accentuée pour les stimulations AMPA et Kainate, par rapport aux neurones corticaux (Regan, 1996). De plus, il semblerait que l'insulte contusive entraîne une baisse de l'expression de la sous-unité GluA₂ (AMPA), thoracique uniquement, mais une augmentation des sous-unités NR₁ et NR_{2A} caudale à la lésion, après 24 h post-TM (Grossman et al., 1999, Grossman et al., 2000). En accord avec l'auteur, ces modulations de ces sous-unités pourraient accentuer les dommages pouvant être causés par excitotoxicité puisque GluA₂ prévient l'entrée calcique par le AMPAR et que le NR₂ serait la sous-unité limitante à la formation du NMDAR (Grossman et al., 2000).

Malgré les évidences salutaires de l'antagonisme de NMDAR (Faden et al., 1988) et délétères de sa stimulation (Faden and Simon, 1988) dans le TM, aucune étude ne traitait de

l'impact de l'excitotoxicité sur l'apoptose jusqu'à l'étude d'Ankarcrona *et al.* en 1995 qui suggère une réponse apoptotique, en plus de nécrotique, chez des neurones *in vitro*, suivant un stimulus glutamatergique excitotoxique (Ankarcrona *et al.*, 1995).

En 2000, après avoir montré l'activation précoce (1 h) de la caspase-3 suivant TM (Springer *et al.*, 1999), l'équipe de Springer *et al.* montra qu'une inhibition du NMDA (MK801) pouvait inhiber celle-ci, tout comme l'inhibition de la calcineurine, leur permettant de tracer une relation entre l'entrée de calcium NMDA-dépendante et l'apoptose précoce post-TM (Springer *et al.*, 2000). Ainsi, la calcineurine activée par l'entrée de calcium déphosphoryle Bad, qui se dissocie de 14-3-3 pour ensuite interagir avec Bcl-x_L sur la mitochondrie et enclencherait une cascade apoptotique intrinsèque caspase-dépendante (Springer *et al.*, 2000).

Chapitre 2 – Les statines

Les statines constituent une classe de médicament développée dans les années '70-'80 qui ont pour objectif thérapeutique la réduction du cholestérol sanguin, généralement dans un contexte de prévention d'événements cardio-vasculaires thrombotiques (i.e. infarctus du myocarde, accident cérébro-vasculaire, etc.) (Endo, 1992). La cible moléculaire commune aux statines est l'enzyme 3-hydroxymethylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), enzyme limitante dans la synthèse du cholestérol, dont elles sont l'inhibiteur (Endo, 1992). En raison de leur efficacité ainsi que de leur relative faible toxicité (Schachter, 2005), les statines sont devenues un atout majeur à la pharmacopée des médecins dans la lutte aux maladies cardio-vasculaires.

Dans le contexte actuel, marqué par une augmentation de l'obésité/diabète/maladies cardio-vasculaires, particulièrement dans les pays financièrement nantis, ce large index thérapeutique a su catapulter les statines au sommet des ventes mondiales. En tête de file de cette classe lucrative de médicament se trouve l'atorvastatine, une statine mise en marché en 1997 (Ther, 1997) par Pfizer (Parke-Davis) et qui, avec ses 11,4 milliards de dollars en revenu mondiale annuelle, représente maintenant plus du quart des ventes biopharmaceutiques de cette compagnie (Rapport annuel de Pfizer – 2009; 03 Janvier 2010).

Atorvastatine (*Lipitor*[®])

Une étude recommande une utilisation allant de 2,5 à 80 mg afin de traiter l'hypercholestérolémie (Cilla et al., 1996b), et conséquemment, l'atorvastatine est offerte en dose de 10, 20, 40 et 80 mg (Pfizer, 2009 : U.S. Prescribing Information).

En plus de l'efficacité de ce médicament, l'atorvastatine s'est également montrée cliniquement apte à diminuer la mortalité chez les patients traités pour des troubles cardio-vasculaire (Sotiriou and Cheng, 2000). Au cours des dernières années, de plus en plus d'évidences portent à croire que les effets salutaires de l'atorvastatine observés dans plusieurs pathologies puissent dépendre de mécanismes indépendants de son action sur le

métabolisme lipidique, c'est-à-dire pléiotropiques, et seront discutés davantage ultérieurement.

Pharmacocinétique

En ce qui concerne la biodisponibilité de l'atorvastatine par voie orale, elle n'est que de 14% et se retrouve lié aux protéines plasmatiques à 98% (Lennernas, 2003). Chez l'humain normocholestérolémique, la demi-vie d'élimination ($t_{1/2}$) sérique de l'atorvastatine administrée par voie orale varie, selon les auteurs, autour de 14 h (allant de 7 à 24 h) (Cilla et al., 1996b, Cilla et al., 1996a, Lennernas, 2003, Pfizer, 2009), et présente un temps à concentration maximale (t_{max}) de 1,9 ou 2,9 h selon le moment de la journée de son administration (matin et soirée, respectivement) (Cilla et al., 1996a). La demi-vie active du produit serait cependant plus longue (20-30h) en raison de l'activité inhibitrice de certains métabolites de l'atorvastatine (Pfizer, 2009). La concentration maximale (C_{max}) ainsi que l'aire sous la courbe (ASC) à 24 h semblent, eux aussi, être influencées à la hausse par une administration matinale, avec des baisses de 31% (95 vs 65,9 ng eq/mL) et de 57% (649 vs 461 ng eq·hr/mL), respectivement, entre le matin et le soir (Cilla et al., 1996a). Également, il fut démontré que la nourriture influençait la biodisponibilité de l'atorvastatine lorsqu'administrée oralement, en diminuant la concentration maximale (-47,9%), le $t_{1/2}$ (-10,4%) et l'aire sous la courbe (-12,7%) et en augmentant le t_{max} (+124%) (Radulovic et al., 1995). Cependant, ni le cycle diurnal ni la prise de nourriture semblent toutefois avoir une incidence sur l'efficacité du médicament (Radulovic et al., 1995, Cilla et al., 1996a). Comme chez plusieurs autres substances, l'âge est un élément important dans l'étude de la pharmacocinétique de l'atorvastatine. En effet, les personnes âgées présentent un C_{max} , un $t_{1/2}$, ainsi qu'une ASC plus élevée que les jeunes sans pourtant observer de différences au niveau de la t_{max} (Gibson et al., 1996). Finalement, la cinétique de l'atorvastatine varie aussi entre homme et femme, cette dernière présentant un C_{max} , un $t_{1/2}$ et une ASC supérieure à celle de l'homme, mais dont le t_{max} est inférieur (Gibson et al., 1996).

Métabolisme

D'abord transporté dans les hépatocytes par diffusion ou transport actif *via* l'OATP C (*Organic Anion Transporting Polypeptide C*), l'atorvastatine est particulièrement métabolisée par le CYP3A4 (Cytochrome P450 3A4) dans le réticulum endoplasmique hépatique (Lennernas, 2003). En effet, la réaction de la forme acide et lactone (ayant une plus grande affinité pour CYP3A4) de l'atorvastatine mène, dans le premier cas, à la formation de l'acide 2-hydroxy-atorvastatine ainsi que de l'acide 4-hydroxy-atorvastatine (responsable de 70% de l'activité inhibitrice sur l'HMG-CoA réductase), et dans le deuxième cas à leur équivalent lactone (métabolites inactifs sur l'HMG-CoA réductase) (Lennernas, 2003). Il est à noter qu'un équilibre lactonisation/hydrolyse existe entre les molécules « mères » ainsi qu'entre leurs métabolites hydroxylés et que la lactonisation constitue une étape importante pour l'excrétion de l'atorvastatine (Lennernas, 2003, Jacobsen et al., 2000).

En plus de cette oxydation de phase I, l'atorvastatine acide ou ses métabolites oxydés sont glucuronidés en phase II par l'UGT 1A1 et 1A3 (UridinediphosphoGlucuronyl Transférases) et peuvent à leur tour, subir une lactonisation (Lennernas, 2003).

Excrétion

L'excrétion de l'atorvastatine et de ses métabolites se fait alors principalement par la bile ou par diffusion directe dans la lumière intestinale pour ensuite être évacuée par les selles. Parmi les transporteurs participant à leur transport dans le canalicule biliaire on compte la *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP), la *Bile Salt Export Pump* (BSEP), la p-glycoprotéine (Pgp) et la *Multidrug Resistant Protein 2* (MRP2). Finalement, notons que moins d'1% est excrété par l'urine (Lennernas, 2003).

Interactions pharmacologiques

Plusieurs médicaments et substances furent aussi démontrés comme pouvant influencer la cinétique de l'atorvastatine. Par exemple, la Cyclosporine, le Lopinavir, le Ritonavir, la Clarithromycin, l'Itraconazole, le jus de pamplemousse, l'Érythromycin, le Rifampin et le

Fenofibrate ont tous la capacité d'augmenter l'aire sous la courbe ainsi que la C_{\max} de l'atorvastatine, mais également de les diminuer dans le cas du Rifampin (Pfizer, 2009 : U.S. Prescribing Information). Le Cimetidine, le Maalox, l'Efavirenz le Rigampin ont, quant à eux, la capacité de diminuer ces paramètres, tandis que le Diltiazem ne fait qu'augmenter l'aire sous la courbe, le Colestipol diminue sa C_{\max} et que le l'Amlodipine et le Gemfibrozil augmentent l'ASC et diminuent le C_{\max} (Pfizer, 2009). L'atorvastatine a également pour effet d'augmenter l'ASC et le C_{\max} de la Digoxin ainsi que de la Norethindrone et de l'Éthinyl estradiol, mais augmente l'ASC et diminue le C_{\max} de l'Antipyrine (Pfizer, 2009).

Pharmacodynamie

Métabolisme du cholestérol

Comme mentionné auparavant, le mode d'action principale de l'atorvastatine passe par l'inhibition de l'HMG-CoA réductase, enzyme limitante hépatique responsable de la production de cholestérol, en catalysant la transformation de l'HMG-CoA en mevalonate, qui, après être phosphorylé, passe sous forme d'isopentyl-phosphate, de géranyl-phosphate puis de farnésyl-phosphate avant d'être transformé en squalène puis en cholestérol (Schachter, 2005).

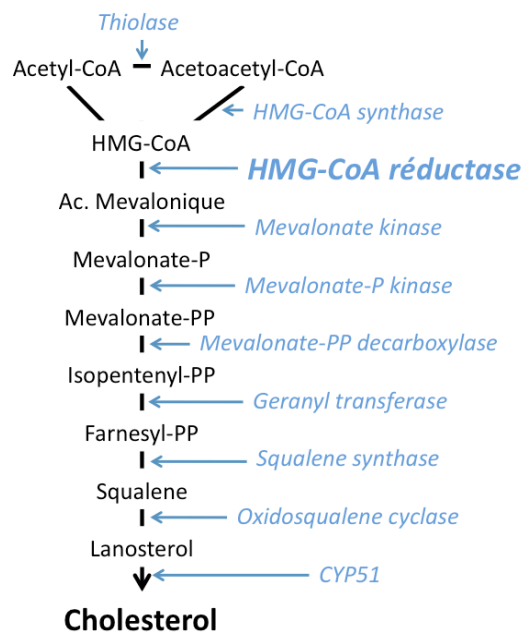


Figure 2.1 Représentation des agents enzymatiques et intermédiaires menant à la synthèse du cholestérol.

Effets pléiotropiques

En addition à la diminution des LDL (*Low-Density Lipoprotein*) procurée par l'inhibition de l'HMG-CoA réductase, l'atorvastatine semble avoir une incidence salutaire par d'autres voies et même dans d'autres contextes que cardio-vasculaire. Il faut noter cependant que certains de ces effets pléiotropiques se retrouvent également chez d'autres statines, suggérant qu'ils pourraient s'agir d'effets de classe tandis que d'autres, tels l'impact sur NF- κ B ou la protection contre l'excitotoxicité corticoneuronale, varient d'une statine à l'autre (Hilgendorff et al., 2003, Zacco et al., 2003). Par un souci de pertinence et de rigueur, seules les effets concernant l'atorvastatine seront donc discutés dans ce chapitre.

Cardiovasculaire

Au niveau cardio-vasculaire, le traitement de CMLV (cellules musculaires lisses vasculaires) et de monocytes par l'atorvastatine réduit, chez le rat, l'activation de NF- κ B par TNF- α et l'angiotensine II (Ang II) (Ortego et al., 1999) ainsi que par le stress oxydatif

(Ortego et al., 2005) et diminue ainsi, dans les deux premier cas, l'expression de chemoattracteurs tels MCP-1 et IP-10 (Ortego et al., 1999). L'effet inhibiteur de l'atorvastatine sur la production/expression de MCP-1 fut également observée chez des monocytes de patients sains après 24 h de traitement (Xu et al., 2003). Similairement, le traitement chronique (6 mois) de patients coronariens à l'atorvastatine permet de constater une atténuation de l'expression et la relâche de MIP-1 α et d'IL-8 chez leurs monocytes périphériques (Waehre et al., 2003).

L'atorvastatine fut aussi démontrée comme inhibiteur de l'activation TNF- α et interféron- γ -dépendante de NF- κ B et de STAT-1 (*Signal Transducer and Activators of Transcription-1*), chez les cellules endothéliales, menant à une diminution de l'induction d'iNOS chez le rat (Wagner et al., 2002) et entraînerait une diminution de l'accumulation des macrophages néointimaux, de l'expression de COX-2 *in vivo* et *in vitro* par les CMLV, et de l'immunoréactivité néointimale pour l'IL-8 et la MMP-3 chez le lapin (Hernandez-Presa et al., 2002). L'atorvastatine aurait aussi un effet inhibiteur sur l'expression CD40-dépendante (plaquettes activées) de COX-2 chez les cellules endothéliales (Mosheimer et al., 2005).

Finalement, chez les CMLV, l'atorvastatine prévient la production de ROS ATII- et EGF (*Epidermal Growth Factor*)-dépendante en réduisant l'expression de la sous-unité nox1 de la NADPH oxydase, sans affecter p22^{phox}, ni SOD ou Glutathion peroxydase, tout en augmentant l'expression de la catalase (Wassmann et al., 2002).

Une multitude d'études traitent aussi des effets anti-inflammatoires de l'atorvastatine pour des périodes chroniques chez l'humain. Brièvement, cette statine diminuerait le *C-Reactive Protein* (CRP), le *Serum Amyloid A* (SAA) et la *Soluble Phospholipase A2* (SPLA2), chez des patients souffrants d'hypercholestérolémie (Wiklund et al., 2002) ainsi que l'IL-6, TNF- α , MCP-1, le nombre de macrophages infiltrant et augmenterait l'IL-10 après 4 semaines post-infarctus du myocarde chez un modèle de rat (Stumpf et al., 2009).

Ceci n'est qu'une sélection grossièrement restreinte des effets rapportés concernant l'atorvastatine dans le domaine cardio-vasculaire. On note cependant que plusieurs de ces

effets, particulièrement ceux entourant les leucocytes ou l'endothélium vasculaire, pourraient également avoir une influence dans l'inflammation au niveau du SNC.

Traumatismes du système nerveux central

En effet, l'administration d'atorvastatine chez la souris stimule l'expression d'eNOS chez les plaquettes et contribue à la diminution du volume infarcté lors d'un accident cérébro-vasculaire expérimental (Laufs et al., 2000). Il protège aussi contre l'ischémie cérébrale en diminuant la production de superoxyde NADPH-dépendante (Hong et al., 2006) et possiblement par la diminution du stress oxydatif chez les neurones, de t-PA (*Tissue Plasminogen Activator*) et l'augmentation d'eNOS (Hayashi et al., 2005, Asahi et al., 2005). Également suivant un accident cérébro-vasculaire, cette statine semblerait se montrer bénéfique en promouvant l'angiogénèse, la prolifération cellulaire, la neurogénèse et possiblement la synaptogénèse (Chen et al., 2003). Ces effets seraient aussi observés dans un contexte d'hémorragie intracérébrale et de traumatisme cortico-cérébral chez le rat (Seyfried et al., 2004, Lu et al., 2004a, Lu et al., 2004b, Lu et al., 2004c, Qu et al., 2005, Wang et al., 2007). Chez cette dernière pathologie, l'atorvastatine présente un effet précoce en diminuant l'œdème cérébral et la peroxydation lipidique à 24 h post-trauma cérébral (Turkoglu et al., 2009) et dans le traumatisme hémorragique sous-arachnoïdien, l'atorvastatine aurait un effet prophylactique positif en abaissant l'apoptose, étudiée *via* l'expression des caspases-3 et -8, tous deux chez le rat (Cheng et al., 2009).

On remarque surtout l'étude de Chen *et al.* pour leur observation de la phosphorylation d'Akt et d'ERK chez des cellules corticales primaires lorsque traitées pendant une heure avec l'atorvastatine (Chen et al., 2003). De plus, chez ce même type cellulaire, l'atorvastatine, tout comme d'autres statines, préviendrait, suite à une exposition soutenue, l'excitotoxicité NMDA et glutamate-dépendante *in vitro* (Zacco et al., 2003, Bosel et al., 2005).

Les propriétés anti-inflammatoires de l'atorvastatine contribueraient également à la réduction de la nociception chez le rat en inhibant la production de cytokines, de prostanoïdes et en stimulant la relâche de NO (Santodomingo-Garzon et al., 2006). En ce

qui concerne la BBB, l'atorvastatine diminuerait l'augmentation TNF- α /IL-1 β -dépendante de MCP-1 et de claudin-3, mais pas d'IL-8, d'*Intracellular Adhesion Molécule-1*, ni de ZO-1 (*Zona Occludens-1*) ou d'Occludine, tout en diminuant l'adhésion des cellules T, chez des cellules endothéliales microvasculaires humaines cérébrales (Buttmann et al., 2007).

Finalement, l'atorvastatine diminuerait l'inflammation, les dommages ainsi que l'apoptose dans des modèles de contusion de la moelle épinières. Ces études seront discutées dans le prochain chapitre.

Effets secondaires

En plus de ses effets thérapeutiques et pléiotropiques, l'utilisation de l'atorvastatine engendre certains effets secondaires, quoiqu'elle soit relativement bien tolérée (Schachter, 2005). En effet, les effets secondaires les plus communs sont les myopathies et la rhabdomyolyse qui, dans de rares occasions, peut mener à une insuffisance rénale aigue causée par une myoglobulinurie (Pfizer, 2009). L'atorvastatine pourrait également affecter l'homéostasie hépatique et Pfizer rapporte qu'elle aurait augmenté l'incidence d'accident cérébro-vasculaire (ACV) chez des patients sans maladies coronarienne mais avec histoire d'ACV ou d'incidents transitoires ischémiques (Pfizer, 2009). Finalement, parmi les effets adverses statistiquement plus fréquents chez les patients traités et affectant plus de 2% d'entre eux on compte : la nasopharyngite (8,3%), des douleurs articulaires (6,9%), de la diarrhée (6,8%), des douleurs aux extrémités (6,0%), l'infection urinaire (5,7%), de la dyspepsie (4,7%), des nausées (4,0%), des douleurs aux muscles squelettiques (3,8%), des spasmes musculaires (3,8%), de la myalgie (3,5%), l'insomnie (3,0%) et des douleurs pharyngolaryngées (2,3%) (Pfizer, 2009).

Chapitre 3 – Les hypothèses – L’atorvastatine dans le traitement du traumatisme médullaire contusif

La première étude impliquant l’atorvastatine dans le traitement du TM fut publiée en 2005 par le groupe du Dr. Singh et démontra qu’une administration quotidienne orale (5 mg/kg saline) d’une durée d’une semaine précédant un traumatisme médullaire thoracique entraînait une récupération locomotrice, évaluée par l’échelle BBB, significativement plus rapide 3 jours post-trauma (Pannu et al., 2005). Devant les propriétés anti-inflammatoires que présente l’atorvastatine dans plusieurs conditions, cette étude se pencha sur l’expression médullaire d’iNOS, ainsi que d’IL-1 β et de TNF- α , et montra une augmentation marquée de ces trois protéines, qui se trouvait inhibée par le traitement à l’atorvastatine. Cette équipe remarque également une diminution de l’infiltration de macrophages/microglie activée ED-1 (*Ectodermal Dysplasia-1*)-positif dans l’épicentre, ainsi que de la présence d’astrocytes réactif (GFAP+) péricentriques, chez les animaux traités après une semaine. D’un point de vue apoptotique, ils rapportent la présence de noyaux TUNEL positifs co-localisant avec NeuN, suggérant un mort neuronale, dans l’épicentre à 24 h ainsi qu’une co-localisation avec PLP (*myelin Proteolipid Protein*, marqueur oligodendrocytique) une semaine post-trauma. Finalement, près de deux semaines après l’insulte, le traitement à l’atorvastatine semblait avoir aussi prévenu la démyélination rostrale, épicentrique et caudale au site contusif.

Bref, ce traitement semble atténuer la réponse inflammatoire post-traumatique, ce qui pourrait expliquer une diminution de l’infiltration et de l’activation des cellules gliales et périphériques qui se traduirait par une diminution précoce et tardive de l’apoptose ainsi que de la démyélination et, ultimement, se refléterait par une récupération accrue et précoce de la fonction locomotrice.

Cette même équipe publia deux ans plus tard une deuxième étude impliquant aussi l’atorvastatine et ses effets sur le traumatisme médullaire (Pannu et al., 2007). Contrairement à l’étude antérieure, celle-ci traitât les rats de façon post-traumatique uniquement (2, 4 ou 6 h post-contusion) et permit de constater une récupération locomotrice soudaine, après 3 jours, et presque complète, après 6 semaines,

lorsqu'administré 2 h post-TM. L'étude microscopique de la nécrose et de la démyélination montra qu'à 24 h ce traitement (2 h post-TM) réduisait la sévérité de ces dommages et un marquage pour MPO et ED-1 permit d'observer une diminution de l'infiltration neutrophilaire et des macrophages chez les animaux traités (2 h post-TM) à l'atorvastatine. Tout comme démontré préalablement, cette équipe remarquât à nouveau une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β , à 6 h post-TM, et d'iNOS, à 24 h post-TM, étudiés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) et immunohistochimie, mais elle remarqua en plus que l'altération de la BSCB (*Blood-Spinal Cord Barrier*), par extravasation de Bleu d'Evans et d'IgG, était diminuée chez les animaux traités après 6 et 24 h post-TM. Cette diminution serait dépendante de l'inhibition RhoA/ROCKII- et TIMP-1- (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1*), dépendante de l'augmentation de MMP-9 induite par les cytokines, et aurait pour conséquence la préservation de ZO-1. Au niveau cellulaire, ils remarquèrent chez les animaux traités (2 h post-TM) une diminution du marquage pour l'APP (*Amyloid Precursor Protein*) et le MBP (*Myelin Basic Protein*) dégradé à 24 h à l'épicentre ainsi qu'une diminution de l'astrogliose. Finalement, tout comme le traitement pré-trauma, le traitement débutant avec la lésion contusive diminua aussi le nombre de cellules TUNEL- et NeuN-positives à l'épicentre, 24 h post-TM, suggérant une diminution de l'apoptose neuronale par l'atorvastatine.

Ces deux études issues du groupe Singh apportent une quantité impressionnante d'évidences pointant vers un caractère bénéfique de l'administration d'atorvastatine dans la prévention des dommages secondaires, plus particulièrement de l'apoptose précoce et tardive, et la récupération locomotrice.

L'apoptose précoce, tel que décrit précédemment, fut aussi observée et caractérisée par de multiples études indépendantes (Kato et al., 1996, Crowe et al., 1997, Liu et al., 1997, Lou et al., 1998, Springer et al., 1999, Lee et al., 2000a, Li et al., 2000, Citron et al., 2000, Springer et al., 2000, Casha et al., 2001, Yune et al., 2003, Bao and Liu, 2004). À notre connaissance, la recherche n'est cependant pas parvenue à découvrir l'élément déclencheur entraînant l'apoptose précoce suivant le TM, mais a mené plutôt à l'identification de

facteurs, tous associés au processus inflammatoire, pouvant contribuer, directement ou indirectement, au développement d'un profil cellulaire apoptotique. Parmi ceux-ci, on compte le stress oxydatif, les cytokines pro-inflammatoires et l'excitotoxicité.

Les observations de Pannu *et al.* concernant l'augmentation des cytokines TNF- α et IL-1 β , sont en accord avec la littérature à ce sujet, c'est-à-dire une augmentation importante aiguë dans les premières minutes/heures suivant l'insulte, et leur diminution constitue probablement un facteur important dans la protection conférée par l'atorvastatine (Bartholdi and Schwab, 1997, Wang et al., 1997, Wang et al., 1996, Beattie et al., 1998, Xu et al., 1998, Yakovlev and Faden, 1994, Rice et al., 2007, Pineau and Lacroix, 2007, Lee et al., 2000b).

En effet, par leur action chimiotactique, l'IL-1 β et le TNF- α favorisent l'infiltration et l'accumulation de neutrophiles et de macrophages au site traumatique. Leur recrutement a pour conséquence leur contribution au stress oxydatif, mais aussi à la relâche d'enzymes protéolytiques, telle que la MMP-9 qui contribue à la disruption de la BSCB (Fleming et al., 2006).

Or, plusieurs autres études ont attribué des propriétés anti-inflammatoires à l'atorvastatine, impliquant justement le stress oxydatif, mais aussi les cytokines pro-inflammatoires. En effet, l'atorvastatine réduit les niveaux sanguins de MCP-1 *in vivo*, mais également *in vitro*, chez des monocytes traités pendant 24 h (Xu et al., 2003, Martin-Ventura et al., 2005, Takebayashi et al., 2005, Blanco-Colio et al., 2007, Tanimoto et al., 2008, Shiraya et al., 2009, Stumpf et al., 2009, Grip et al., 2002). Elle abaisse aussi la production de TNF- α et de MMP-9 chez des monocytes *in vitro* (Grip et al., 2002), ainsi que chez les niveaux sanguin de patients (Mozaffarian et al., 2005, Sola et al., 2006, Riad et al., 2007, Castro et al., 2008). Cependant la cinétique d'infiltration des macrophages, vers 48 h post-TM, suggère cependant que son inhibition par une réduction des cytokines/chemokines trophiques, entre autres, ne résulterait pas en une diminution de l'apoptose précoce, mais pourrait toutefois contribuer à la récupération motrice.

Cliniquement, des dosages sanguins attribuent aussi à l'atorvastatine des propriétés anti-inflammatoires (Sugiyama et al., 2005, Singh et al., 2008, Riad et al., 2007, Castro et al.,

2008). Expérimentalement, elle est reconnue comme inhibant l'expression d'iNOS, une enzyme responsable de la production de *NO , du moins dans les cellules endothéliales (Wagner et al., 2002), composé pouvant réagir avec l'anion superoxyde pour former le peroxy-nitrite (Liu et al., 2000).

L'excitotoxicité est un autre élément susceptible de contribuer à l'apoptose dans le TM (Lu et al., 2000). Ce phénomène fut démontré comme entraînant l'apoptose de manière caspase-3 dépendante chez les neurones corticaux et serait accentué par le stress oxydatif (Tenneti and Lipton, 2000, Leist et al., 1997). On remarque cependant que les neurones corticaux semblent être protégés contre l'excitotoxicité par l'atorvastatine (Bosel et al., 2005, Zacco et al., 2003). Il est donc probable que cette protection s'applique aussi aux cellules neuronales, et peut-être même gliales, de la matière grise contre l'apoptose précoce, ou dans les faisceaux de matière blanche de façon tardive (Park et al., 2004).

Finalement, des voies de survie cellulaire semblent être directement activées par l'atorvastatine chez des cellules neuronales en culture (Chen et al., 2003), ce qui protégerait contre l'apoptose précoce et l'inhibition isoprenoïde-dépendante de l'activité de RhoA pourrait favoriser la croissance neuronale dans un environnement extracellulaire réfractaire post-TM.

Ainsi, en plus des études du groupe Singh, un vaste champ d'évidences supporte l'hypothèse que l'atorvastatine réduirait l'apoptose et favoriserait la récupération locomotrice suivant un traumatisme de la moelle épinière, potentiellement par une protection contre l'excitotoxicité, la diminution des cytokines pro-inflammatoires et du stress oxydant, par l'activation de voies de survie (Akt, ERK) et en favorisant la préservation de la barrière hémato-médullaire, lors de la phase inflammatoire précoce post-TM. Cette préservation cellulaire aiguë et l'atténuation de l'inhibition myélique, par l'action inhibitrice sub-chronique de l'atorvastatine sur l'activation de RhoA/ROCKII, pourraient conjointement se traduire en une meilleure récupération locomotrice à long terme. Nous postulons donc que l'atorvastatine présente un potentiel anti-apoptotique à un temps précoce (i.e. ≤ 4 h) chez le rat suivant un traumatisme médullaire contusif et qu'elle

possède la capacité de favoriser la récupération locomotrice, lorsqu'administré dans un contexte cliniquement pertinent (i.e. 2 h post-trauma, quotidien 15 jours).

Chapitre 4 – Atorvastatin prevents early apoptosis after thoracic spinal cord contusion injury and promotes locomotion recovery

Marc-André Déry, Guy Rousseau, Mohamed Benderdour, Eric Beaumont

Abstract

The systemic administration of atorvastatin has been shown to be neuroprotective after spinal cord injury (SCI), by decreasing the inflammatory response at the lesion site and by reducing neuronal and oligodendrocyte apoptosis. The latter effect spares white matter at the injury site and improves locomotion. The aim of this study was to confirm the neuroprotective efficacy of atorvastatin as well as its early action in limiting apoptosis with its administration post-SCI. Female Sprague-Dawley rats received an intra peritoneal injection of: 1) statin/saline (5 mg/kg) at 2 hours after the contusion injury; 2) physiological saline at 2 hours post-SCI; or 3) physiological saline without injury. Statin-treated rats showed significant ($p < 0.05$) improvement in locomotion at week 4 post-SCI compared to vehicle-treated animals. Explaining this outcome, caspase-3 activity decreased by 50% ($p < 0.05$), and the histological TUNEL method revealed a decrease of approximately 20% in apoptotic cells at the injury site ($p < 0.01$) at 4 hours post-SCI in atorvastatin-treated rats in comparison to vehicle-treated controls. These data demonstrate that atorvastatin is effective after experimental spinal cord contusion injury in preventing early apoptosis at the injury site within 2 hours post-administration.

Keywords: atorvastatin, rats, spinal cord injury, apoptosis, locomotion

Acknowledgements: This work was supported by the Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal and Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). We thank France Vaillancourt for her expert guidance and assistance. We also thank Louis Chiocchio for his help with veterinary care.

Spinal cord injury (SCI) is a primary, irreversible, mechanical insult followed by a secondary cascade that promotes additional cell death, reducing the chances of proper functional locomotor recovery. This second injury involves many processes, including excitotoxicity [23], oxidative stress [4] and inflammation [14], all of which lead to apoptosis and the death of potentially viable cells.

Statins, a class of drugs that inhibit HMG-CoA reductase, are known to limit secondary damage through cholesterol-dependent [12] and pleiotropic effects, including protection against Alzheimer's disease [3] and multiple sclerosis [20]. Therapy with statins modulates endothelial function and preserves blood flow after ischemia by targeting the vascular wall, inflammatory cells, platelets and the brain parenchyma [3]. In fact, oral administration of atorvastatin to adult rats from day 1–7 after middle cerebral artery occlusion spares neurological function and neural tissue at ischemic brain injury sites and these benefits appear to be mediated by statin-induced amplification of synaptogenesis, neurogenesis, and angiogenesis [8]. Moreover, oral or subcutaneous atorvastatin treatment of experimental encephalomyelitis in adult mice reduces upper and lower extremity weakness, paralysis and the incidence of relapse [2].

After traumatic SCI, breakdown of the blood-spinal cord barrier (BSCB) is considered central to secondary damage in the rat model and also in SCI patients between 4–8 h after the initial insult [5,11]. The consequence is the extravasation of albumin, edema and sponginess of the spinal cord tissue [27]. Recent evidence suggests that atorvastatin protects the BSCB when administered between 2 and 6 h after contusive injuries, by suppressing isoprenoid-dependent RhoA activation and preventing matrix metalloproteinase 9 expression. BSCB protection is likely to be responsible for inhibiting infiltration by tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and inducible nitric oxide synthase at injury sites [22]. The consequence is a reduction of the neuronal apoptotic state at 24 h post-SCI, detected by a terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling (TUNEL) assay [22]. The aim of the present study was to evaluate the early neuronal apoptotic state in the injured spinal cord and the early efficacy of the atorvastatin treatment using the SCI contusion rat model. For human safety and security

with statins, this report is likely to have a positive clinical outcome in handling acute traumatic SCI patients.

Forty-two adult female Sprague-Dawley rats (225–250 g, Charles River, St-Constant, Quebec, Canada) were used in this study. First, the animals were placed on a feedback-controlled, heating blanket to prevent a drop in temperature during surgery and lesion induction. They received antibiotics (Duplocillin, 0.2 mg/kg, i.m.) immediately post-operatively and again 2 and 4 days later. The rats were then anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, IP), and a laminectomy was performed to expose the T10 spinal cord segment. In the control (sham) group, the muscles and skin were closed after laminectomy. To produce contusive injuries in the SCI groups, their vertebral columns were stabilized with stereotaxic clamps, and moderate SCI was produced by dropping a weight of 5 g from a height of 6 cm (30 g cm impact). The muscles and skin were then sutured. The bladder was voided after SCI by gently massaging the lower abdomen twice daily until reflexive or voluntary emptying occurred. The animals were kept on a 12:12 h light/dark cycle with water and food *ad libitum*. They were provided with softened food in their cages, and long sipper tubes on water bottles ensured easy access to water. After SCI, the rats were randomized to four separate groups: (1) Acute vehicle-treated rats (n = 11) received an intra peritoneal (IP) saline injection at 2 h post-SCI and were killed at 4 h post-SCI (2 h post-treatment). The spinal cord at the injury site was excised for the evaluation of caspase-3 activity and TUNEL assay. (2) Chronic vehicle-treated rats (n = 6) were kept alive to assess locomotion on a weekly basis for 4 weeks according to Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scores [6] and to quantify the area of spared white matter at the injury site at 4 weeks post-SCI. (3) Acute atorvastatin-treated rats received an IP injection (5 mg/kg of body weight) diluted in saline (n = 8) at 2 h post-SCI and were sacrificed at 4 h post-SCI for the evaluation of caspase-3 activity and TUNEL assay. (4) Chronic atorvastatin-treated rats (n = 6) were kept alive for 4 weeks for locomotion and histology assessment. These four SCI groups were compared to uninjured controls (n = 11). For the chronic state (groups 2 and 4), the initial dose was followed by a single daily dose of 5 mg/kg for 15 days.

TUNEL assay was undertaken, as described previously by our group [30], in accordance with the protocol provided by the manufacturer (Oncogene, Cambridge, MA, USA). In summary, 10 μm cryostat sections were fixed in paraformaldehyde (4%) and rinsed, then permeabilized. After washing, the labeling reaction was performed for 1 h at 37 °C. The reaction was stopped, and all nuclei were stained with propidium iodide (1 μM). The samples were viewed in a Leica epi illumination microscope with a filter for DAPI (330–380 nm). All sections were photographed at the same magnification (400 \times) with a Nikon Coolpix 995 camera. A second picture of the section was taken with a filter for propidium iodide to count the total number of cells (PI positive). Image J software (version 1.33u) was used to determine the number of positive cells and the total number of cells. Cells are positive when the superposition of the pictures gives a yellow spot (green and red). A total of 20–25 pictures were taken of each sample, with quantification of total and positive cell number. Enzymatic caspase-3 activity was evaluated with commercial kits [29]. Tissues were sonicated in lysis buffer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), left on ice for 10 min, and centrifuged. Protein concentration of the supernatants was measured according to the bicinchoninic acid method (Pierce, Rockford, IL, USA). Total proteins (50 μg) were reacted with 200 μM DEVD-*p*NA substrate in the presence of 100 μL reaction buffer. After 16 h of incubation at 37 °C, *p*-nitroanilide release was studied at 465 nm.

The efficacy of atorvastatin treatment was analyzed by BBB open field locomotor scores, since this particular 21-point scale was developed to assess hindlimb function after thoracic SCI [6,7]. All animals ($n = 42$) had a BBB score of 21/21 before any manipulation. Therefore, BBB score was altered either by contusion injury and/or the effect of atorvastatin. At 4 weeks post-SCI, chronic rats were euthanized with pentobarbital (250 mg/kg, IP) and perfused transcardially with oxygenated, calcium-free tyrodes, then with 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The spinal cords were removed, post-fixed overnight in 4% paraformaldehyde and transferred to 30% sucrose solution for 2–4 days. Thereafter, the thoracic spinal cords were blocked in optical coherence tomography (OCT) tissue-freezing medium, cut into 10 μm slices on a cryostat, mounted on charged glass slides, and stored at -20 °C. Sections from the injury epicenter

of each spinal cord were stained according to the cresyl echt violet method [17,25]. The slides were photographed with a digital camera (Nikon Coolpix, Tokyo, Japan) attached to a microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Regions of interest were measured as cross-sectional areas (mm^2). The spared white matter at the injury epicenter was identified as being evenly and lightly stained [17].

Histology and caspase-3 activity were compared among treatment groups (means \pm SD) by analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni correction. Mixed design ANOVA was used to compare the effect of time and treatment on locomotion. These analyses were performed by SPSS version 13 (Chicago, IL, USA). The number of TUNEL-positive cells was compared among treatment groups by Chi-square analysis, followed by partitioning the degrees of freedom according to Siegel and Castellan [28]. $p < 0.05$ was considered significant.

We first assessed the functional efficacy of atorvastatin by evaluating locomotion performance with BBB scores [6]. All rats had a BBB score of 21/21 before SCI, and each SCI rat had a score of 0/21 within 24 h post-SCI. From week 0 to 4 post-SCI, Mauchly's test indicated that the assumption of sphericity had not been violated for the effect of time: $\chi^2(9) = 0.27$, $p = 0.28$. All effects are reported to be significant at $p < 0.05$. There was a significant main effect of time: $F(4,40) = 448.6$. Contrasts (deviation) revealed that every time period studied was different from the overall experimental effect. A significant group effect suggested that locomotion was different between groups: $F(1,10) = 28.4$, $p < 0.001$. A significant interaction effect was apparent between time and the experimental groups ($F(4,40) = 7.4$), indicating that treatment had different effects on locomotion every week. To break down this interaction, contrasts (deviation) were analyzed to compare specific weeks to the overall experimental effect. Significant interaction was almost reached for week 3: $F(1,10) = 4.74$, $p = 0.055$. They revealed significant interaction when comparing week 4 to the overall experimental effect: $F(1,10) = 13.6$, $p < 0.05$ (Fig. 1). Other times were similar. Locomotor performance between the injured groups at week 4 post-SCI was significant, since an average BBB of 10 in the vehicle-treated group allowed us to study occasional weight-supported steps without any coordination between the forelimbs and

hindlimbs. Furthermore, an average BBB score of 14 in statin-treated rats allowed them to take consistent, weight-supported steps along with consistent coordination between the forelimbs and hindlimbs.

Histology showed that the area of spared spinal cord tissue at the injury epicenter in both SCI groups was not different ($p = 0.12$), with $42 \pm 6\%$ of tissue-sparing in the statin-treated group and $34 \pm 8\%$ in the vehicle-treated group. Furthermore, values for both injured groups were significantly lower ($p < 0.01$) in comparison to uninjured sham rats (100%), indicating that there was no change in gross spinal cord tissue morphology due to the neuroprotective effect of atorvastatin. TUNEL highlighted cells undergoing apoptosis after SCI by labeling DNA fragments generated by activated endonucleases [31]. Our results showed a significant increase ($p < 0.05$) in TUNEL-positive cells at the injury site in vehicle-treated rats compared to both the control and statin groups. Interestingly, in atorvastatin-treated rats, SCI failed to significantly augment the number of TUNEL-positive cells in comparison to uninjured animals (Table 1 and Fig. 2). In addition, SCI-induced apoptosis was further investigated via the measurement of caspase-3 proteolytic activity. Indeed, contusive injury elicited a significant increase of spinal cord caspase-3 activity in vehicle-treated rats compared to the uninjured controls. However, this elevation was prevented by atorvastatin treatment, resulting in caspase-3 activity similar to that in uninjured controls, as shown in Fig. 3.

Previous studies of atorvastatin treatment have indicated its effectiveness in decreasing inflammation and cellular apoptosis post-SCI, contributing to spinal cord tissue-sparing at injury sites and locomotion recovery [21,22]. The present investigation examined short-term efficacy in decreasing the apoptotic state at 4 h post-SCI when atorvastatin was given at 2 h post-SCI. The BSCB was disrupted immediately post-SCI, after which infiltration of macrophages and neutrophils occurred at the injury site [19,24]. Once compromised, BSCB “leakiness” is known to persist for a few days. Our data demonstrate that the IP administration of atorvastatin after SCI could cross and/or protect the BSCB and significantly decrease the apoptotic state within 2 h post-treatment. Furthermore, we did not find any difference between spared neuronal tissues at the injury site between SCI groups,

which was also the case for Pannu et al. [21,22]. Consequently, locomotion recovery was only significant between SCI groups at week 4 post-SCI, and it was present from day 3 to 42 post-SCI according to the report by Pannu et al. [21,22]. This could be related to injury severity, since vehicle-treated rats in our study had a BBB score of 5 (n = 6, contusion of 30 g cm) at week 1 post-SCI, and average BBB score was 2 (n = 6, contusion of 40 g cm) according to Pannu et al. [21,22]. Therefore, statin treatment could be more effective in very severe contusion type injuries. On the other hand, it is unlikely that the oral statin administration technique could be more effective in comparison to IP injections, since gastrointestinal function is severely altered after SCI [18,26], decreasing gastrointestinal transit efficacy.

Recent reports have demonstrated injury-induced GTPase Rho pathway activation to be crucial in several degenerative events post-SCI [9,16]. Indeed, Rho-pathway inhibition has been shown to prevent endothelial dysfunction and neuronal apoptosis [10,1]. By inhibiting the cholesterol synthesis pathway, statins indirectly deplete the supply of isoprenoids and inactivate Rho, which requires post-translational prenylation to function [15]. Statin treatment post-SCI is effective in re-establishing locomotion recovery and decreasing apoptosis [21,22]. This is of critical value, since neuroprotection after SCI has the potential to improve function, with only a few residual axons needed to achieve significant locomotion recovery [7]. Therefore, the early neuroprotective effect of statins could be a crucial aspect when developing a pharmacological strategy aimed at limiting the secondary injury cascade after SCI. Also, since immune suppression has been found to be beneficial in preserving the homeostasis of transplanted cells [13], the anti-inflammatory actions of atorvastatin, when administered post-SCI [22], could be significant in combination with cell grafting by creating an optimal growth environment. Overall, the general safety of statins, along with their neuroprotective efficacy, suggests that atorvastatin could be a prime candidate for human trials, since this report showed beneficial results within 2 h after atorvastatin administration.

References

- [1] P. Adamson, S. Etienne, P.O. Couraud, V. Calder, J. Greenwood, Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway, *J. Immunol.* 162 (5) (1999) 2964–2973.
- [2] O. Aktas, S. Waiczies, A. Smorodchenko, J. Dorr, B. Seeger, T. Prozorovski, S. Sallach, M. Endres, S. Brocke, R. Nitsch, F. Zipp, Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin, *J. Exp. Med.* 197 (6) (2003) 725–733.
- [3] S. Amin-Hanjani, N.E. Stagliano, M. Yamada, P.L. Huang, J.K. Liao, M.A. Moskowitz, Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice, *Stroke* 32 (4) (2001) 980–986.
- [4] D.K. Anderson, E.D. Hall, Pathophysiology of spinal cord trauma, *Ann. Emerg. Med.* 22 (6) (1993) 987–992.
- [5] D. Bartholdi, M.E. Schwab, Methylprednisolone inhibits early inflammatory processes but not ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in the rat, *Brain Res.* 672 (1–2) (1995) 177–186.
- [6] D.M. Basso, M.S. Beattie, J.C. Bresnahan, A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats, *J. Neurotrauma* 12 (1) (1995) 1–21.
- [7] D.M. Basso, M.S. Beattie, J.C. Bresnahan, Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection, *Exp. Neurol.* 139 (2) (1996) 244–256.
- [8] J. Chen, Z.G. Zhang, Y. Li, Y. Wang, L. Wang, H. Jiang, C. Zhang, M. Lu, M. Katakowski, C.S. Feldkamp, M. Chopp, Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke, *Ann. Neurol.* 53 (6) (2003) 743–751.
- [9] P. Dergham, B. Ellezam, C. Essagian, H. Avedissian, W.D. Lubell, L. McKerracher, Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair, *J. Neurosci.* 22 (15) (2002) 6570–6577.
- [10] J. Greenwood, C.E. Walters, G. Pryce, N. Kanuga, E. Beraud, D. Baker, P. Adamson, Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and

- attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis, *Faseb. J.* 17 (8) (2003) 905–907.
- [11] C.Y. Hsu, M.R. Dimitrijevic, Methylprednisolone in spinal cord injury: the possible mechanism of action, *J. Neurotrauma.* 7 (3) (1990) 115–119.
- [12] E.S. Istvan, J. Deisenhofer, Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase, *Science* 292 (5519) (2001) 1160–1164.
- [13] S. Karimi-Abdolrezaee, E. Eftekharpour, J. Wang, C.M. Morshead, M.G. Fehlings, Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury, *J. Neurosci.* 26 (13) (2006) 3377–3389.
- [14] R.W. Keane, A.R. Davis, W.D. Dietrich, Inflammatory and apoptotic signaling after spinal cord injury, *J. Neurotrauma.* 23 (3–4) (2006) 335–344.
- [15] S. Leonard, L. Beck, M. Sinensky, Inhibition of isoprenoid biosynthesis and the post-translational modification of pro-p21, *J. Biol. Chem.* 265 (9) (1990) 5157–5160.
- [16] T. Madura, T. Yamashita, T. Kubo, M. Fujitani, K. Hosokawa, M. Tohyama, Activation of Rho in the injured axons following spinal cord injury, *EMBO Rep.* 5 (4) (2004) 412–417.
- [17] D.S. Magnuson, R. Lovett, C. Coffee, R. Gray, Y. Han, Y.P. Zhang, D.A. Burke, Functional consequences of lumbar spinal cord contusion injuries in the adult rat, *J. Neurotrauma.* 5 (4) (2005) 529–543.
- [18] B.A. Medeiros, C.L. dos Santos, R.C. Palheta, D.A. de Queiroz Jr., A.A. da Graca, Y. dos Santos, F.H. Rola, A.A. Lima, A. Gondim Fde, Spinal cord transection modifies ileal fluid and electrolyte transport in rats, *Auton. Neurosci.* 139 (1–2) (2008) 24–29.
- [19] L.J. Noble, J.R. Wrathall, The blood-spinal cord barrier after injury: pattern of vascular events proximal and distal to a transection in the rat, *Brain Res.* 424 (1) (1987) 177–188.
- [20] A.S. Paintlia, M.K. Paintlia, M. Khan, T. Vollmer, A.K. Singh, I. Singh, HMG-CoA reductase inhibitor augments survival and differentiation of oligodendrocyte progenitors in animal model of multiple sclerosis, *Faseb J.* 19 (11) (2005) 1407–1421.
- [21] R. Pannu, E. Barbosa, A.K. Singh, I. Singh, Attenuation of acute inflammatory

response by atorvastatin after spinal cord injury in rats, *J. Neurosci. Res.* 79 (3) (2005) 340–350.

[22] R. Pannu, D.K. Christie, E. Barbosa, I. Singh, A.K. Singh, Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury, *J. Neurochem.* 101 (1) (2007) 182–200.

[23] E. Park, A.A. Velumian, M.G. Fehlings, The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration, *J. Neurotrauma.* 21 (6) (2004) 754–774.

[24] P.G. Popovich, P.J. Horner, B.B. Mullin, B.T. Stokes, A quantitative spatial analysis of the blood-spinal cord barrier. I. Permeability changes after experimental spinal contusion injury, *Exp. Neurol.* 142 (2) (1996) 258–275.

[25] M.M. Powers, G. Clark, An evaluation of cresyl echt violet acetate as a Nissl stain, *Stain Technol.* 30 (2) (1955) 83–88.

[26] C.L. Rodrigues, F.A. Gondim, P.R. Leal, F.D. Camurca, C.C. Freire, A.A. dos Santos, F.H. Rola, Gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid throughout the first month after thoracic spinal cord transection in awake rats, *Dig. Dis. Sci.* 46 (8) (2001) 1604–1609.

[27] H.S. Sharma, Pathophysiology of blood-spinal cord barrier in traumatic injury and repair, *Curr. Pharm. Des.* 11 (11) (2005) 1353–1389.

[28] S. Siegel, N.J.J. Castellan, *Nonparametric Statistics*, McGraw-Hill, Boston, Mass, 1988, 399.

[29] F. Vaillancourt, H. Fahmi, Q. Shi, P. Lavigne, P. Ranger, J.C. Fernandes, M. Benderdour, 4-Hydroxynonenal induces apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes: the protective role of glutathione-S-transferase, *Arthritis Res. Ther.* 10 (5) (2008) R107.

[30] B.P. Wann, T.M. Bah, M. Boucher, J. Courtemanche, N. Le Marec, G. Rousseau, R. Godbout, Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression, *J. Psychiatry. Neurosci.* 32 (1) (2007) 11–16.

[31] J.H. Zhang, M. Xu, DNA fragmentation in apoptosis, *Cell Res.* 10 (3) (2000) 205–211.

Figures and legends

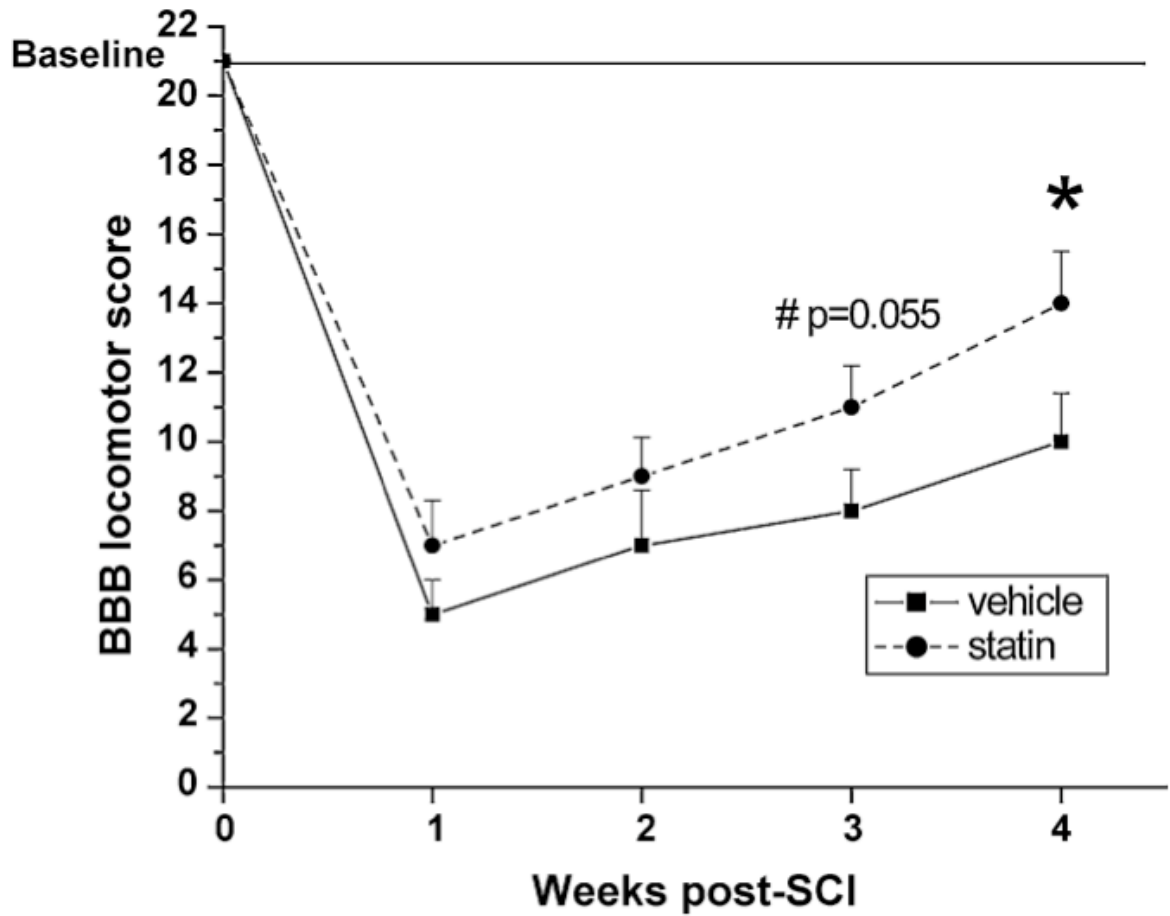


Figure. 1. Effect of atorvastatin treatment on locomotion after spinal cord injury (SCI). Locomotion, evaluated according to BBB scores, was significantly higher in statin-treated rats ($n = 6$) compared to vehicle-treated controls ($n = 6$) at 4 weeks post-contusion injury. *Significantly different compared to the vehicle group with $p < 0.01$. Error bars represent standard deviations.

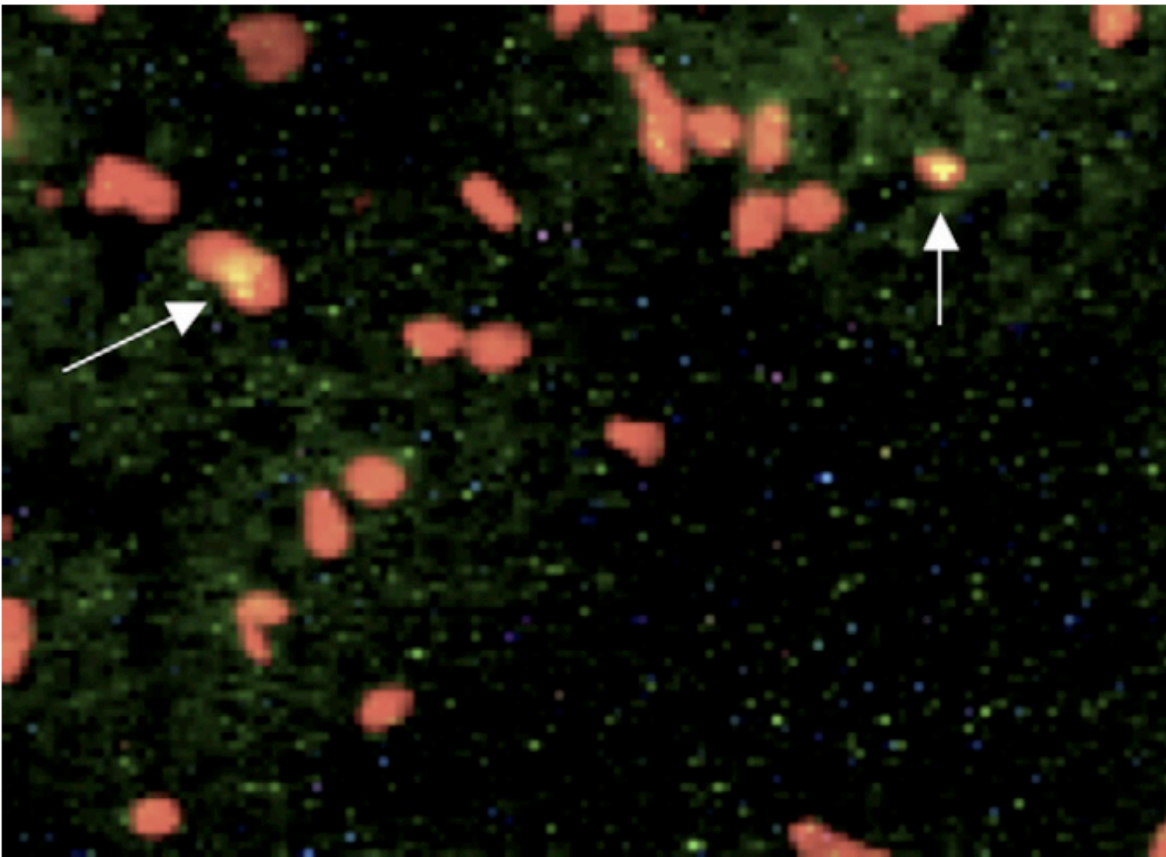


Figure. 2. Atorvastatin protects against contusion-induced apoptosis in the rat spinal cord. A representative image illustrates both TUNEL-positive apoptotic cells (yellow) and neuron nuclei (red). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

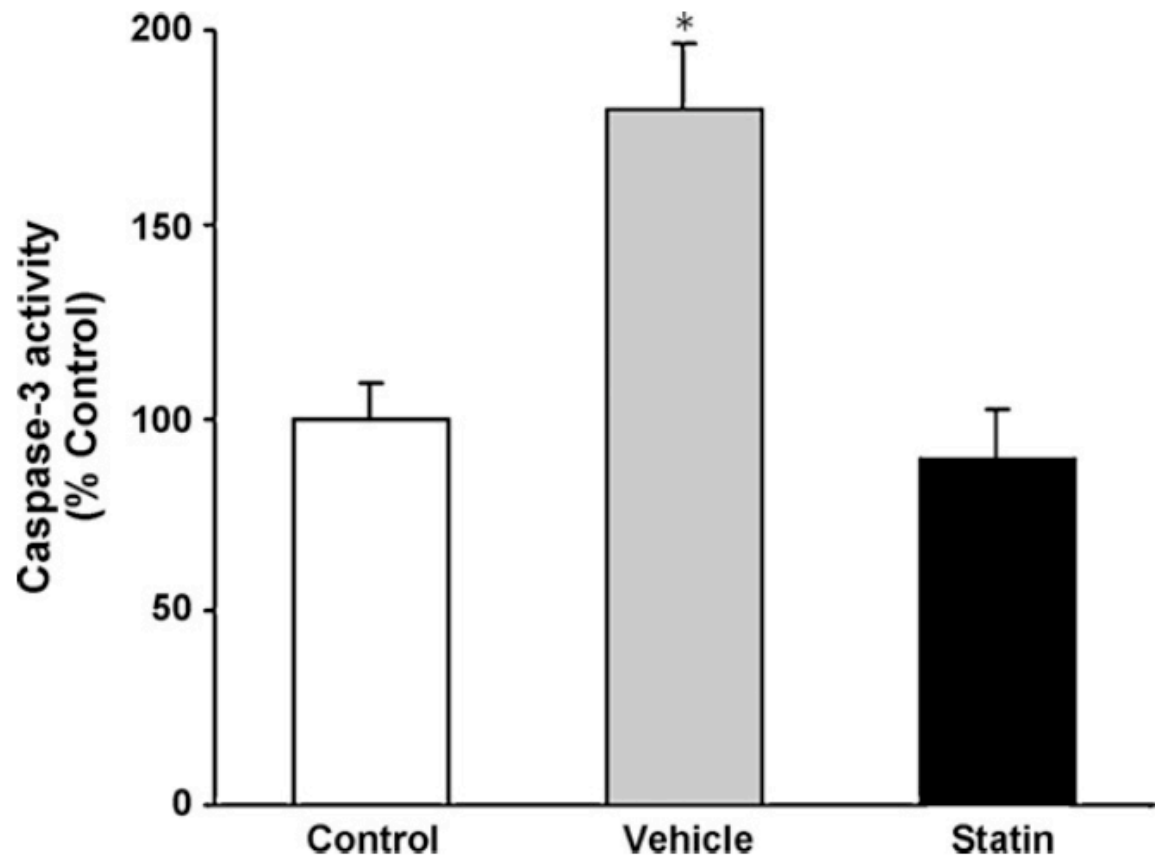


Figure. 3. Spinal cord contusion injury results in a significant increase of caspase-3 activity at the lesion site in vehicle-treated rats (n = 11) compared to the controls (n = 11). However, statin treatment (n = 8) is beneficial in preserving the apoptotic state at the uninjured control level. *Significantly different compared to the other groups with $p < 0.05$. Error bars represent standard deviations.

Table 1

Chi-square analysis showed that the vehicle group had more apoptotic neuronal cells compared to the other groups at 4 h post SCI with $p < 0.05$.

Group	Positive Cells	Total Cells	% Positive Cells
Naïve	8	4323	0.19
Vehicle	25	4610	0.54
Statin	11	3416	0.32

$\chi^2=8.116$; $p<0.02$ among groups, $\chi^2=7.112$; $p<0.05$ vehicle vs. control and statin.

Chapitre 5 – Discussion des résultats

L'acheminement d'un médicament au tissu cible est une facette cruciale dans l'accomplissement de son action thérapeutique. Chez l'humain, il est connu que l'atteinte de la concentration maximale d'atorvastatine se situe, lorsqu'administrée oralement, autour de 2 h (Pfizer, 2009, Cilla et al., 1996a, Radulovic et al., 1995). Quoiqu'aucune information concernant le t_{max} de l'atorvastatine administré chez le rat par voie intrapéritonéale n'ait été trouvée, il est possible de spéculer qu'il soit égal ou inférieur à une administration orale, considérant la diminution de l'efficacité du transit gastro-intestinale suivant un TM (Rodrigues et al., 2001). Devant l'absence de données sur cet aspect de la pharmacocinétique de ce médicament chez le rat, un dosage aurait pu avoir été effectué (plusieurs méthodes disponibles) afin de confirmer une livraison adéquate au site contusif dans des délais concordant avec la réduction de l'apoptose précoce (Erturk et al., 2003, Zarghi et al., 2005, Bahrami et al., 2005, Shen et al., 2006). Quoiqu'il en soit, les résultats positifs obtenus témoignent d'une livraison efficace et suffisante à l'obtention d'effets bénéfiques sur l'apoptose précoce.

En ce qui concerne l'étude de la récupération locomotrice par l'échelle BBB, les résultats obtenus dans cette étude diffèrent sensiblement des résultats de Pannu *et al.* (Pannu et al., 2007). En effet, cette équipe rapporte une récupération fulgurante après à peine trois jours de traitement post-TM, alors que, dans notre étude, une différence significative ne fut atteinte qu'à 4 semaines chez animaux ayant été traité pendant 15 jours post-TM (Pannu et al., 2007, Dery et al., 2009). Pourtant, le début et la nature du traitement (2 h post-TM + quotidien) furent les mêmes pour les deux études, tout comme : la dose (5 mg/kg), le véhicule (saline), l'espèce/race et le sexe des animaux (Rats Sprague-Dawley femelles). Par contre, on note comme différence leur abstention d'utiliser des antibiotiques prophylactiques ou d'analgésiques postopératoires, précautions que nous avons employées par souci éthique et en raison du faible risque présumé que présentaient ces substances sur l'issue de l'expérience. Parmi les différences les plus pertinentes pouvant expliquer cette divergence de résultats, on compte la route d'administration de l'atorvastatine, étant orale dans leur cas et intrapéritonéale dans la notre, ainsi que le site de contusion. En effet, le

site contusif était légèrement plus rostral dans notre étude (T10 vs T12), ce qui a pour conséquence une région efférente affectée plus étendue, mais qui ne se solderait probablement pas par une récupération à long terme des membres inférieurs atténuée, puisque que les nerfs moteurs et sensitifs rejoignent la moelle épinière à des niveaux plus caudaux (lombo-sacré).

La force de l'impact, quant à elle, différait aussi, mais se trouvait inférieure dans notre étude (30 vs 40 g·cm), ce qui pourrait favoriser une meilleure récupération. Finalement, la nature relativement qualitative de l'échelle BBB pourrait contribuer à la divergence entre les résultats de récupération locomotrice.

Notre étude fut également l'occasion de remarquer, pour la première fois, que la diminution du nombre de cellules TUNEL-positives, préalablement observées à 24 h (Pannu et al., 2007, Pannu et al., 2005), était également présentes à un temps beaucoup plus précoce, soit 4 h post-TM, lorsqu'une dose d'atorvastatine était administrée par voie intrapéritonéale 2 h post-TM chez le rat (Dery et al., 2009).

Le synchronisme entre l'administration d'atorvastatine et l'induction de la production de certaines cytokines pro-inflammatoires laisse croire que la réduction de l'apoptose puisse emprunter ce mécanisme, plus particulièrement *via* TNF- α . En effet, l'induction de cette cytokine se fait très tôt post-TM (Pannu et al., 2005, Lee et al., 2000b) et contribue à la stimulation de NOS (Yune et al., 2003). Comme mentionné auparavant, le NO peut contribuer au dommage oxydatif et favoriserait l'entrée en apoptose par voie intrinsèque, mitochondrie-dépendante (Satake et al., 2000, Bao and Liu, 2003, Yune et al., 2003). Aussi, le TNF- α a la capacité d'agir directement sur les cellules et activer l'apoptose *via* le TNFR. Cette apoptose est dite « extrinsèque » et implique l'activation de la caspase-8 (Nagata, 1997). Or, à six heures post-TM, on retrouve justement une augmentation de l'immunoréactivité pour ces deux caspases dans la matière grise de l'épicentre (Keane et al., 2001).

Malheureusement, la voie apoptotique empruntée n'a pas été caractérisée davantage dans notre étude, il est donc impossible de démontrer que la réduction de l'apoptose précoce soit tributaire d'une diminution de l'induction de TNF- α , quoique qu'une telle diminution par

l'atorvastatine fut observée par Pannu *et al* (Pannu et al., 2007). Par contre, une étude confirmant la présence d'apoptose (TUNEL) à 4h, remarqua que l'injection suivant l'insulte, d'anticorps anti-TNF- α réduisait l'apoptose, mais seulement à 24 h, tandis que les niveaux de NOS se trouvaient abaissés à 4 h, ce qui suggère un rôle accessoire de TNF- α dans l'apoptose précoce (4 h) (Lee et al., 2000a). De plus, des expériences sur des animaux *knock out* montrent que l'abolition du gène codant pour NOS, mais pas codant pour TNF- α , se montrerait bénéfique pour la récupération locomotrice post-TM, pointant ainsi vers la même conclusion (Farooque et al., 2001).

Les voies Akt et ERK seraient aussi potentiellement impliquées dans la réduction de l'apoptose précoce. En effet, la stimulation de cellules neuro-corticales primaires par l'atorvastatine (0.5 μ M) pendant une heure entraîne une activation de la protéine Akt, mais également d'ERK (Chen et al., 2003). Cette activation est particulièrement intéressante en raison du rôle anti-apoptotique que présente l'activation d'Akt (Goswami et al., 1999) et d'ERK, tout deux ayant été démontrés comme étant nécessaires à la survie des motoneurones et la prévention de leur entrée en apoptose (Newbern et al., 2005). Des constats similaires ont aussi été fait *in vivo*, où l'on remarque, notamment, une activation d'Akt et d'ERK associée à une baisse du nombre de cellules TUNEL+, dans le striatum de rats traités quotidiennement pendant 5 jours ainsi qu'une activation d'Akt dans l'hippocampe de rats suite à un traitement quotidien d'une semaine à l'atorvastatine (Piermartiri et al., 2009, Lee et al., 2008). Quoique l'activation de ces voies par l'atorvastatine aie été observée chez des cellules cérébrales (corticales, striatum, hippocampe), il est fort probable que cette action s'applique également aux cellules médullaires, gliales ou neuronales. Aussi, le mécanisme d'activation d'Akt par l'atorvastatine n'a pas été, à notre connaissance, caractérisé, mais il est probable qu'il s'agisse d'un phénomène de classe puisque qu'on le retrouve également chez la simvastatine (Sugawara et al., 2008a, Sugawara et al., 2008b) et la pravastatine et qu'il est prévenu par l'ajout de L-mévalonate, chez des cellules endothéliales (Kureishi et al., 2000). De plus, les expériences *in vitro* de Chen *et al.* suggèrent que l'activation de ces voies de survie cellulaire soit directe. Ceci est particulièrement intéressant et surprenant puisque l'activité

inhibitrice sur l'HMG-CoA réductase de l'atorvastatine, *in vivo*, est principalement attribuable (70%) à ses formes métabolisés par le CYP3A4 hépatique, les 2- et 4-hydroxy-atorvastatines (Lennernas, 2003).

Brièvement, le constat de Hong *et al.* concernant l'effet inhibiteur de l'atorvastatine sur l'expression de la sous-unité catalytique p91^{phox} de la NADPH oxydase cérébrale et la diminution du stress oxydant qui en découle, représentent aussi une autre voie d'investigation potentielle dans la caractérisation de l'inhibition de l'apoptose post-TM (Hong et al., 2006).

Finalement, rappelons l'étude de Bosel *et al.* qui, sur des neurones primaires corticaux, démontre une neuroprotection procurée par l'atorvastatine *in vitro* contre l'excitotoxicité glutamate-dépendante et qui semble soutenir un modèle anti-apoptotique en remarquant une diminution des noyaux condensés causés par le glutamate (Bosel et al., 2005). De plus près, on remarque que cette étude teste aussi l'effet de l'atorvastatine sur la mort cellulaire par ischémie (hypoxie/sans glucose) et par endommagement de l'ADN (camptothécine; 10 μ m), sans toutefois noter d'effet significatif.

Étrangement, le potentiel anti-apoptotique de l'atorvastatine ne semble pas être universel. En effet, on ne peut passer sous silence les nombreux rapports de l'action pro-apoptotique de l'atorvastatine, notamment sur les cellules musculaires lisses vasculaires (Blanco-Colio et al., 2002), les cellules tumorales du lymphome de Dalton (Ajith et al., 2008), les cellules de Kupffer hépatiques (Aprigliano et al., 2008) et dans une certaine mesure les cellules tumorales PC-3 (Zheng et al., 2007). Les voies signalétiques impliquées varient d'un type cellulaire à l'autre, allant d'un clivage de Bid ERK-dépendant, à une modulation de Bax/Bcl₂ (Aprigliano et al., 2008, Blanco-Colio et al., 2002). Cependant, aucune étude ne rapporte, à notre connaissance, d'effet pro-apoptotique de l'atorvastatine chez un type cellulaire du système nerveux, quoique la lovastatine et la mevastatine pourraient potentialiser l'activité de la caspase-3 chez des HT22 (hippocampe murin) (Focking et al., 2004).

Une critique pouvant être adressée à ce projet de recherche concerne la nature des cellules en apoptose. En effet, aucune attention n'a été portée à l'identité des cellules TUNEL+, ce

qui aurait pourtant pu contribuer à caractériser l'apoptose précoce post-TM, mais aussi le mode d'action de l'atorvastatine dans ce contexte. De plus, plusieurs marqueurs cellulaires sont disponibles et couramment employés en immunohistochimie pour différencier les types cellulaires d'une coupe. Par exemple, le marquage de NeuN aurait permis d'identifier les neurones, OX-42 pour la microglie (résidente ou activée) ou GFAP pour les astrocytes réactifs.

Autre critique à soulever, l'étude de l'apoptose par la méthode de TUNEL ne fait pas unanimité. En effet, certains avanceront que cette méthode manque de spécificité pour l'apoptose en marquant également les cellules en réparation nucléaire (Kanoh et al., 1999). Cette remarque est valable mais perd en légitimité lorsque les résultats TUNEL sont combinés à l'activité de la caspase exécutive -3.

De plus, le faible nombre de cellules positives rapporté dans notre étude peut également remettre en cause, pour certains, la pertinence des variations observées entre les groupes. Tout d'abord, précisons que le temps expérimental (i.e. 4 h post-TM) figure parmi les plus précoces rapportés par la littérature et constitue donc le début de la vague apoptotique et que celle-ci s'accroît en progressant. De plus, il est important de comprendre que la méthode de TUNEL ne représente qu'une capture statique d'un phénomène temporellement dynamique et transitoire. Par conséquent, même un nombre réduit, mais significativement différent entre les groupes, de cellules présentant un clivage nucléaire à un moment donné, peut représenter, sur une longue période, une quantité considérable de cellules perdues.

À ce propos, quel est l'impact d'une réduction apoptotique sur la récupération locomotrice? Plusieurs articles servent de support à l'hypothèse que la mort cellulaire attribuable à l'apoptose se reflète à terme sur les fonctions locomotrices dans le traumatisme médullaire (Li et al., 2000, Colak et al., 2005, Sribnick et al., 2007, Arnold et al., 2000). Cependant, il est important de préciser que cette idée ne fait pas unanimité, puisqu'Ozawa *et al.* n'observe pas d'amélioration locomotrice suite à l'administration par plusieurs voies d'un inhibiteur de caspases (Ozawa et al., 2002). Pourtant, il est généralement reconnu que de très petites préservations dans la matière blanche (5-10%; voire <5% dans le faisceau ventral suivant un traumatisme dorsal, selon les auteurs) pouvait se traduire par une

amélioration de la récupération locomotrice (Mautès et al., 2000, Blight and Decrescito, 1986, Schucht et al., 2002). Ainsi, la sauvegarde des oligodendrocytes de la matière blanche pourrait contribuer à la préservation d'un nombre intéressant d'axones et se traduire en une récupération accrue. Cependant, l'apoptose précoce atteint principalement la matière grise et non les faisceaux de matière blanche, ce qui pèse lourdement contre cette hypothèse (Liu et al., 1997). Néanmoins, l'atténuation de l'inflammation décrite par plusieurs concernant l'atorvastatine pourrait se montrer bénéfique sur la préservation de la matière blanche et n'exclut pas que l'atorvastatine administrée de façon sub-chronique protège contre l'apoptose tardive de la matière blanche.

Ceci mène vers le deuxième point saillant de ce mémoire, soit l'observation de l'effet bénéfique qu'a l'atorvastatine sur la récupération locomotrice post-TM. Comme mentionné, en se basant sur les données recueillies, il est impossible de tracer, ni d'exclure, avec certitude un lien de causalité entre la diminution de l'apoptose précoce et la récupération locomotrice après 4 semaines. Cette incertitude plane également autour d'une hypothétique préservation de la matière blanche par une réduction de l'inflammation.

Le deuxième mécanisme potentiellement impliqué dans la promotion de la récupération locomotrice par l'atorvastatine fait appel à son pouvoir inhibiteur sur la petite protéine G RhoA/ROCK. En effet, celui-ci fut mis en évidence par plusieurs dans un contexte de TM (Dergham et al., 2002, Winton et al., 2002, Sung et al., 2003, Pannu et al., 2007, Chan et al., 2005) et l'utilisation d'inhibiteurs de RhoA/ROCKII suscite l'intérêt et constitue une voie d'avenir dans la promotion de la récupération neurologique (Kwon et al., 2002, Mueller et al., 2005, McKerracher and Higuchi, 2006, Baptiste and Fehlings, 2006, Onose et al., 2009, David and Lacroix, 2003). L'activité de RhoA/ROCKII est inhibée par l'atorvastatine *via* l'inhibition de l'HMG-CoA réductase et la diminution conséquente des isoprénoides. Ceci prévient la geranylgeranylation de RhoA, son association à la membrane et par le fait même, son activité (Laufs and Liao, 2000). Cette hypothèse est encouragée par l'observation que l'inhibition de la voie des mévalonates par la simvastatine réduirait *in vitro* l'inhibition de la croissance des neurites, ce qui suggère même un effet de classe (Holmberg et al., 2006)

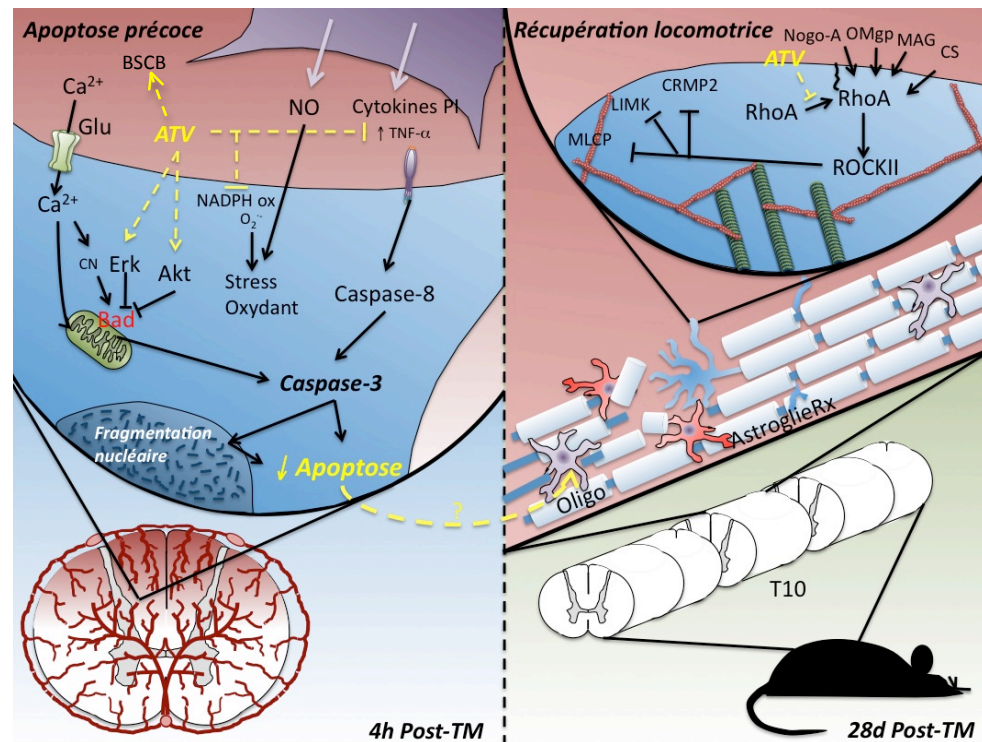


Figure 5.1 Modes d'action potentiels de l'atorvastatine dans l'atténuation de l'apoptose précoce post-TM et dans l'amélioration de la récupération locomotrice.

La voie RhoA/ROCKII pourrait finalement être impliquée dans la perméabilisation de la barrière hémato-médullaire. Sa perméabilisation est accentuée dans l'inflammation et se montre nécessaire au passage des cytokines ainsi que des leucocytes. D'une part, l'atorvastatine fut démontrée comme pouvant prévenir ce phénomène chez des cultures de cellules endothéliales cérébrales humaines à des concentrations pharmacologiques (Buttmann et al., 2007). Parallèlement, tel que mentionné auparavant, le pouvoir inhibiteur de l'atorvastatine sur la perméabilisation de la barrière hémato-médullaire fut démontré par Pannu *et al.* et passait par une inhibition isoprénolide-dépendante de RhoA/ROCKII qui se traduisait par une diminution de l'expression de MMP-9 (Pannu et al., 2007). Précisons que ce mécanisme, quoique très intéressant, reste tout de même à être corroboré par une équipe indépendante.

Finalement, en ce qui concerne l'effet protecteur de l'atorvastatine dans la récupération locomotrice suivant un traumatisme médullaire contusif, le débat demeure ouvert. En effet, une publication récente conteste les résultats de Pannu *et al.* en affirmant ne pas remarquer d'amélioration locomotrice suivant un même traitement (Mann *et al.*, 2010, Pannu *et al.*, 2007). Nos résultats se trouvent donc entre deux constats antithétiques puisque la récupération que nous observons se trouve à des temps beaucoup plus tardifs que pour Pannu *et al.* , mais qui, contrairement à Mann *et al.*, demeurent présents. Ainsi, ce débat commande plus d'investigations, qu'il s'agisse de confirmer cette issue ou pour mieux la caractériser.

Conclusion

En conclusion, cette étude visait la confirmation et la caractérisation des effets protecteurs de l'atorvastatine sur l'apoptose précoce et la récupération locomotrice suivant un traumatisme médullaire contusif chez le rat.

Ceci permit de confirmer le caractère anti-apoptotique de l'administration d'atorvastatine 2 h post-trauma, de confirmer la présence d'apoptose à 4 h post-trauma au site de la contusion et de démontrer pour la première fois qu'une telle administration d'atorvastatine diminuait l'apoptose à ce temps expérimental. En effet, on remarque une diminution à 4 h du nombre de cellules TUNEL positives ainsi que de l'activité de la caspase-3 au site de la lésion chez les animaux traités. Parallèlement, un traitement quotidien de 15 jours à l'atorvastatine résulte en une récupération locomotrice améliorée chez les animaux traités après quatre semaines seulement.

Compte tenu des nombreuses propriétés anti-inflammatoires de l'atorvastatine, ces résultats supportent l'importance de l'inflammation dans les dommages secondaires suivant le traumatisme médullaire contusif. Cependant, davantage de recherche reste à être effectuée, particulièrement en ce qui entoure le mécanisme d'action de cette statine. À terme, ces recherches ainsi que celles effectuées par d'autres groupes, pourront mener à l'élaboration de meilleurs traitements et une réduction potentielle de la morbidité entourant les traumatismes médullaires.

Bibliographie

- ABE, Y., YAMAMOTO, T., SUGIYAMA, Y., WATANABE, T., SAITO, N., KAYAMA, H. & KUMAGAI, T. (1999) Apoptotic cells associated with Wallerian degeneration after experimental spinal cord injury: a possible mechanism of oligodendroglial death. *J Neurotrauma*, 16, 945-52.
- ADACHI, K., YIMIN, Y., SATAKE, K., MATSUYAMA, Y., ISHIGURO, N., SAWADA, M., HIRATA, Y. & KIUCHI, K. (2005) Localization of cyclooxygenase-2 induced following traumatic spinal cord injury. *Neurosci Res*, 51, 73-80.
- AGRAWAL, S. K. & FEHLINGS, M. G. (1996) Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na⁺, Na⁺-K⁺-ATPase, the Na⁺-H⁺ exchanger, and the Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci*, 16, 545-52.
- AGRAWAL, S. K. & FEHLINGS, M. G. (1997) Role of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *J Neurosci*, 17, 1055-63.
- AHN, Y. H., LEE, G. & KANG, S. K. (2006) Molecular insights of the injured lesions of rat spinal cords: Inflammation, apoptosis, and cell survival. *Biochem Biophys Res Commun*, 348, 560-70.
- AJITH, T. A., ANU, V. & RIJI, T. (2008) Antitumor and apoptosis promoting properties of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, against Dalton's Lymphoma Ascites tumor in mice. *J Exp Ther Oncol*, 7, 291-8.
- ANDERSON, D. K. & HALL, E. D. (1993) Pathophysiology of spinal cord trauma. *Ann Emerg Med*, 22, 987-92.
- ANKARCRONA, M., DYPBUKT, J. M., BONFOCO, E., ZHIVOTOVSKY, B., ORRENIUS, S., LIPTON, S. A. & NICOTERA, P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15, 961-73.
- APRIGLIANO, I., DUDAS, J., RAMADORI, G. & SAILE, B. (2008) Atorvastatin induces apoptosis by a caspase-9-dependent pathway: an in vitro study on activated rat hepatic stellate cells. *Liver Int*, 28, 546-57.
- ARNOLD, P. M., CITRON, B. A., AMEENUDDIN, S., MALLADI, S., WANG, X. & FESTOFF, B. W. (2000) Caspase-3 inhibition is neuroprotective after spinal cord injury. *J Neurochem*, 74, S73.
- ARUNDINE, M. & TYMIANSKI, M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34, 325-37.

- ASAHI, M., HUANG, Z., THOMAS, S., YOSHIMURA, S., SUMII, T., MORI, T., QIU, J., AMIN-HANJANI, S., HUANG, P. L., LIAO, J. K., LO, E. H. & MOSKOWITZ, M. A. (2005) Protective effects of statins involving both eNOS and tPA in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25, 722-9.
- BAHRAMI, G., MOHAMMADI, B., MIRZAEI, S. & KIANI, A. (2005) Determination of atorvastatin in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 826, 41-5.
- BAO, F., BAILEY, C. S., GURR, K. R., BAILEY, S. I., ROSAS-ARELLANO, M. P., DEKABAN, G. A. & WEAVER, L. C. (2009) Increased oxidative activity in human blood neutrophils and monocytes after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 215, 308-16.
- BAO, F., CHEN, Y., DEKABAN, G. A. & WEAVER, L. C. (2004) An anti-CD11d integrin antibody reduces cyclooxygenase-2 expression and protein and DNA oxidation after spinal cord injury in rats. *J Neurochem*, 90, 1194-204.
- BAO, F., DEKABAN, G. A. & WEAVER, L. C. (2005) Anti-CD11d antibody treatment reduces free radical formation and cell death in the injured spinal cord of rats. *J Neurochem*, 94, 1361-73.
- BAO, F. & LIU, D. (2002) Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces neuron death and neurological deficits. *Neuroscience*, 115, 839-49.
- BAO, F. & LIU, D. (2003) Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptotic cell death and activates caspase-3. *Neuroscience*, 116, 59-70.
- BAO, F. & LIU, D. (2004) Hydroxyl radicals generated in the rat spinal cord at the level produced by impact injury induce cell death by necrosis and apoptosis: protection by a metalloporphyrin. *Neuroscience*, 126, 285-95.
- BAPTISTE, D. C. & FEHLINGS, M. G. (2006) Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *J Neurotrauma*, 23, 318-34.
- BARTHOLDI, D. & SCHWAB, M. E. (1997) Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci*, 9, 1422-38.
- BEATTIE, M. S., FAROOQUI, A. A. & BRESNAHAN, J. C. (2000) Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 17, 915-25.
- BEATTIE, M. S., SHUMAN, S. L. & BRESNAHAN, J. C. (1998) Apoptosis and spinal cord injury. *Neuroscientist*, 4, 163.
- BENVENISTE, E. N., SPARACIO, S. M., NORRIS, J. G., GRENETT, H. E. & FULLER, G. M. (1990) Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J Neuroimmunol*, 30, 201-12.

- BETHEA, J. R., CASTRO, M., KEANE, R. W., LEE, T. T., DIETRICH, W. D. & YEZIERSKI, R. P. (1998) Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *J Neurosci*, 18, 3251-60.
- BLANCO-COLIO, L. M., MARTIN-VENTURA, J. L., DE TERESA, E., FARSANG, C., GAW, A., GENSINI, G., LEITER, L. A., LANGER, A., MARTINEAU, P. & EGIDO, J. (2007) Elevated ICAM-1 and MCP-1 plasma levels in subjects at high cardiovascular risk are diminished by atorvastatin treatment. Atorvastatin on Inflammatory Markers study: a substudy of Achieve Cholesterol Targets Fast with Atorvastatin Stratified Titration. *Am Heart J*, 153, 881-8.
- BLANCO-COLIO, L. M., VILLA, A., ORTEGO, M., HERNANDEZ-PRESA, M. A., PASCUAL, A., PLAZA, J. J. & EGIDO, J. (2002) 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis*, 161, 17-26.
- BLIGHT, A. R. (2002) Miracles and molecules--progress in spinal cord repair. *Nat Neurosci*, 5 Suppl, 1051-4.
- BLIGHT, A. R. & DECRESCITO, V. (1986) Morphometric analysis of experimental spinal cord injury in the cat: the relation of injury intensity to survival of myelinated axons. *Neuroscience*, 19, 321-41.
- BONFOCO, E., KRAINIC, D., ANKARCRONA, M., NICOTERA, P. & LIPTON, S. A. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7162-6.
- BOSEL, J., GANDOR, F., HARMS, C., SYNOWITZ, M., HARMS, U., DJOUFACK, P. C., MEGOW, D., DIRNAGL, U., HORTNAGL, H., FINK, K. B. & ENDRES, M. (2005) Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem*, 92, 1386-98.
- BRESNAHAN, J. C., SHUMAN, S. L. & BEATTIE, M. S. (1996) Evidence for apoptosis of oligodendroglia in long tracts undergoing wallerian degeneration after spinal cord injury (SCI). *Soc. Neurosci. Abstr.*, 22, 1185.
- BUTTKE, T. M. & SANDSTROM, P. A. (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, 15, 7-10.
- BUTTMANN, M., LORENZ, A., WEISHAUPT, A. & RIECKMANN, P. (2007) Atorvastatin partially prevents an inflammatory barrier breakdown of cultured human brain endothelial cells at a pharmacologically relevant concentration. *J Neurochem*, 102, 1001-8.
- BYRNES, K. R., GARAY, J., DI GIOVANNI, S., DE BIASE, A., KNOBLACH, S. M., HOFFMAN, E. P., MOVSESYAN, V. & FADEN, A. I. (2006) Expression of two

- temporally distinct microglia-related gene clusters after spinal cord injury. *Glia*, 53, 420-33.
- BYRNES, K. R., STOICA, B., RICCIO, A., PAJOOHESH-GANJI, A., LOANE, D. J. & FADEN, A. I. (2009) Activation of metabotropic glutamate receptor 5 improves recovery after spinal cord injury in rodents. *Ann Neurol*, 66, 63-74.
- CARDONE, M. H., ROY, N., STENNICKE, H. R., SALVESEN, G. S., FRANKE, T. F., STANBRIDGE, E., FRISCH, S. & REED, J. C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282, 1318-21.
- CARLSON, S. L., PARRISH, M. E., SPRINGER, J. E., DOTY, K. & DOSSETT, L. (1998) Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol*, 151, 77-88.
- CARRIEDO, S. G., YIN, H. Z., SENSI, S. L. & WEISS, J. H. (1998) Rapid Ca²⁺ entry through Ca²⁺-permeable AMPA/Kainate channels triggers marked intracellular Ca²⁺ rises and consequent oxygen radical production. *J Neurosci*, 18, 7727-38.
- CASHA, S., YU, W. R. & FEHLINGS, M. G. (2001) Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, 103, 203-18.
- CASTRO, P. F., MIRANDA, R., VERDEJO, H. E., GREIG, D., GABRIELLI, L. A., ALCAINO, H., CHIONG, M., BUSTOS, C., GARCIA, L., MELLADO, R., VUKASOVIC, J. L., GODOY, I. & LAVANDERO, S. (2008) Pleiotropic effects of atorvastatin in heart failure: role in oxidative stress, inflammation, endothelial function, and exercise capacity. *J Heart Lung Transplant*, 27, 435-41.
- CHAN, C. C., KHODARAHMI, K., LIU, J., SUTHERLAND, D., OSCHIPOK, L. W., STEEVES, J. D. & TETZLAFF, W. (2005) Dose-dependent beneficial and detrimental effects of ROCK inhibitor Y27632 on axonal sprouting and functional recovery after rat spinal cord injury. *Exp Neurol*, 196, 352-64.
- CHARRIAUT-MARLANGUE, C. (2004) Apoptosis: a target for neuroprotection. *Therapie*, 59, 185-90.
- CHEN, J., ZHANG, Z. G., LI, Y., WANG, Y., WANG, L., JIANG, H., ZHANG, C., LU, M., KATAKOWSKI, M., FELDKAMP, C. S. & CHOPP, M. (2003) Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol*, 53, 743-51.
- CHENG, G., WEI, L., ZHI-DAN, S., SHI-GUANG, Z. & XIANG-ZHEN, L. (2009) Atorvastatin ameliorates cerebral vasospasm and early brain injury after subarachnoid hemorrhage and inhibits caspase-dependent apoptosis pathway. *BMC Neurosci*, 10, 7.
- CHEUNG, E. C. & SLACK, R. S. (2004) Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. *Sci STKE*, 2004, PE45.

- CHOI, D. W. (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*, 7, 369-79.
- CHOI, D. W. (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci*, 11, 465-9.
- CILLA, D. D., JR., GIBSON, D. M., WHITFIELD, L. R. & SEDMAN, A. J. (1996a) Pharmacodynamic effects and pharmacokinetics of atorvastatin after administration to normocholesterolemic subjects in the morning and evening. *J Clin Pharmacol*, 36, 604-9.
- CILLA, D. D., JR., WHITFIELD, L. R., GIBSON, D. M., SEDMAN, A. J. & POSVAR, E. L. (1996b) Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 60, 687-95.
- CITRON, B. A., ARNOLD, P. M., SEBASTIAN, C., QIN, F., MALLADI, S., AMEENUDDIN, S., LANDIS, M. E. & FESTOFF, B. W. (2000) Rapid upregulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell death. *Exp Neurol*, 166, 213-26.
- COLAK, A., KARAOGLAN, A., BARUT, S., KOKTURK, S., AKYILDIZ, A. I. & TASYUREKLI, M. (2005) Neuroprotection and functional recovery after application of the caspase-9 inhibitor z-LEHD-fmk in a rat model of traumatic spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*, 2, 327-34.
- CROWE, M. J., BRESNAHAN, J. C., SHUMAN, S. L., MASTERS, J. N. & BEATTIE, M. S. (1997) Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med*, 3, 73-6.
- CROWE, M. J., SHUMAN, S. L., MASTERS, J. N., BRESNAHAN, J. C. & BEATTIE, M. S. (1995) Morphological evidence suggesting apoptotic nuclei in spinal cord injury. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 21, 232.
- CULMSEE, C. & MATTSON, M. P. (2005) p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 331, 761-77.
- D'SOUZA, S., ALINAUSKAS, K., MCCREA, E., GOODYER, C. & ANTEL, J. P. (1995) Differential susceptibility of human CNS-derived cell populations to TNF-dependent and independent immune-mediated injury. *J Neurosci*, 15, 7293-300.
- DATTA, S. R., BRUNET, A. & GREENBERG, M. E. (1999) Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev*, 13, 2905-27.
- DATTA, S. R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y. & GREENBERG, M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91, 231-41.
- DAVID, S. & LACROIX, S. (2003) Molecular approaches to spinal cord repair. *Annu Rev Neurosci*, 26, 411-40.

- DERGHAM, P., ELLEZAM, B., ESSAGIAN, C., AVEDISSIAN, H., LUBELL, W. D. & MCKERRACHER, L. (2002) Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci*, 22, 6570-7.
- DERY, M. A., ROUSSEAU, G., BENDERDOUR, M. & BEAUMONT, E. (2009) Atorvastatin prevents early apoptosis after thoracic spinal cord contusion injury and promotes locomotion recovery. *Neurosci Lett*, 453, 73-6.
- DEVIVO, M. J. (1997) Causes and costs of spinal cord injury in the United States. *Spinal Cord*, 35, 809-13.
- EMERY, E., ALDANA, P., BUNGE, M. B., PUCKETT, W., SRINIVASAN, A., KEANE, R. W., BETHEA, J. & LEVI, A. D. (1998) Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*, 89, 911-20.
- ENDO, A. (1992) The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res*, 33, 1569-82.
- ERTURK, S., ONAL, A. & MUGE CETIN, S. (2003) Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 793, 193-205.
- FADEN, A. I., LEMKE, M., SIMON, R. P. & NOBLE, L. J. (1988) N-methyl-D-aspartate antagonist MK801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats: behavioral, anatomic, and neurochemical studies. *J Neurotrauma*, 5, 33-45.
- FADEN, A. I. & SIMON, R. P. (1988) A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol*, 23, 623-6.
- FAROOQUE, M., ISAKSSON, J. & OLSSON, Y. (2001) Improved recovery after spinal cord injury in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice but not in TNF-alpha-deficient mice. *J Neurotrauma*, 18, 105-14.
- FILBIN, M. T. (2003) Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci*, 4, 703-13.
- FITCH, M. T. & SILVER, J. (2008) CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol*, 209, 294-301.
- FLEMING, J. C., NORENBERG, M. D., RAMSAY, D. A., DEKABAN, G. A., MARCILLO, A. E., SAENZ, A. D., PASQUALE-STYLES, M., DIETRICH, W. D. & WEAVER, L. C. (2006) The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*, 129, 3249-69.
- FOCKING, M., BESSELMANN, M. & TRAPP, T. (2004) Statins potentiate caspase-3 activity in immortalized murine neurons. *Neurosci Lett*, 355, 41-4.
- FRANKLIN, J. L. (2003) Programmed neuronal death. *Antioxid Redox Signal*, 5, 583-7.

- GARD, A. L., SOLODUSHKO, V. G., WAEG, G. & MAJIC, T. (2001) 4-Hydroxynonenal, a lipid peroxidation byproduct of spinal cord injury, is cytotoxic for oligodendrocyte progenitors and inhibits their responsiveness to PDGF. *Microsc Res Tech*, 52, 709-18.
- GAVIRIA, M., PRIVAT, A., D'ARBIGNY, P., KAMENKA, J., HATON, H. & OHANNA, F. (2000) Neuroprotective effects of a novel NMDA antagonist, Gacyclidine, after experimental contusive spinal cord injury in adult rats. *Brain Res*, 874, 200-9.
- GHIRNIKAR, R. S., LEE, Y. L. & ENG, L. F. (2000) Chemokine antagonist infusion attenuates cellular infiltration following spinal cord contusion injury in rat. *J Neurosci Res*, 59, 63-73.
- GHIRNIKAR, R. S., LEE, Y. L. & ENG, L. F. (2001) Chemokine antagonist infusion promotes axonal sparing after spinal cord contusion injury in rat. *J Neurosci Res*, 64, 582-9.
- GIBSON, D. M., BRON, N. J., RICHENS, A., HOUNSLOW, N. J., SEDMAN, A. J. & WHITFIELD, L. R. (1996) Effect of age and gender on pharmacokinetics of atorvastatin in humans. *J Clin Pharmacol*, 36, 242-6.
- GIULIAN, D. & ROBERTSON, C. (1990) Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. *Ann Neurol*, 27, 33-42.
- GOSWAMI, R., KILKUS, J., DAWSON, S. A. & DAWSON, G. (1999) Overexpression of Akt (protein kinase B) confers protection against apoptosis and prevents formation of ceramide in response to pro-apoptotic stimuli. *J Neurosci Res*, 57, 884-93.
- GRIP, O., JANCIAUSKIENE, S. & LINDGREN, S. (2002) Atorvastatin activates PPAR-gamma and attenuates the inflammatory response in human monocytes. *Inflamm Res*, 51, 58-62.
- GROSSMAN, S. D., WOLFE, B. B., YASUDA, R. P. & WRATHALL, J. R. (1999) Alterations in AMPA receptor subunit expression after experimental spinal cord contusion injury. *J Neurosci*, 19, 5711-20.
- GROSSMAN, S. D., WOLFE, B. B., YASUDA, R. P. & WRATHALL, J. R. (2000) Changes in NMDA receptor subunit expression in response to contusive spinal cord injury. *J Neurochem*, 75, 174-84.
- HAINS, B. C., YUCRA, J. A. & HULSEBOSCH, C. E. (2001) Reduction of pathological and behavioral deficits following spinal cord contusion injury with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398. *J Neurotrauma*, 18, 409-23.
- HAMADA, Y., IKATA, T., KATOH, S., NAKAUCHI, K., NIWA, M., KAWAI, Y. & FUKUZAWA, K. (1996) Involvement of an intercellular adhesion molecule 1-dependent pathway in the pathogenesis of secondary changes after spinal cord injury in rats. *J Neurochem*, 66, 1525-31.

- HARADA, H., BECKNELL, B., WILM, M., MANN, M., HUANG, L. J., TAYLOR, S. S., SCOTT, J. D. & KORSMEYER, S. J. (1999) Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell*, 3, 413-22.
- HAYASHI, T., HAMAKAWA, K., NAGOTANI, S., JIN, G., LI, F., DEGUCHI, K., SEHARA, Y., ZHANG, H., NAGANO, I., SHOJI, M. & ABE, K. (2005) HMG CoA reductase inhibitors reduce ischemic brain injury of Wistar rats through decreasing oxidative stress on neurons. *Brain Res*, 1037, 52-8.
- HERNANDEZ-PRESA, M. A., MARTIN-VENTURA, J. L., ORTEGO, M., GOMEZ-HERNANDEZ, A., TUNON, J., HERNANDEZ-VARGAS, P., BLANCO-COLIO, L. M., MAS, S., APARICIO, C., ORTEGA, L., VIVANCO, F., GERIQUE, J. G., DIAZ, C., HERNANDEZ, G. & EGIDO, J. (2002) Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 160, 49-58.
- HEXUM, T. D. & FRIED, R. (1979) Effects of superoxide radicals on transport (Na + K) adenosine triphosphatase and protection by superoxide dismutase. *Neurochem Res*, 4, 73-82.
- HILGENDORFF, A., MUTH, H., PARVIZ, B., STAUBITZ, A., HABERBOSCH, W., TILLMANN, H. & HOLSCHERMANN, H. (2003) Statins differ in their ability to block NF-kappaB activation in human blood monocytes. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 41, 397-401.
- HIRBEC, H., GAVIRIA, M. & VIGNON, J. (2001) Gacyclidine: a new neuroprotective agent acting at the N-methyl-D-aspartate receptor. *CNS Drug Rev*, 7, 172-98.
- HOLMBERG, E., NORDSTROM, T., GROSS, M., KLUGE, B., ZHANG, S. X. & DOOLEN, S. (2006) Simvastatin promotes neurite outgrowth in the presence of inhibitory molecules found in central nervous system injury. *J Neurotrauma*, 23, 1366-78.
- HONG, H., ZENG, J. S., KREULEN, D. L., KAUFMAN, D. I. & CHEN, A. F. (2006) Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291, H2210-5.
- HSU, C. Y., HALUSHKA, P. V., HOGAN, E. L. & COX, R. D. (1986) Increased thromboxane level in experimental spinal cord injury. *J Neurol Sci*, 74, 289-96.
- HURLBERT, R. J. (2000) Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg*, 93, 1-7.
- ISAAC, L. & PEJIC, L. (1995) Secondary mechanisms of spinal cord injury. *Surg Neurol*, 43, 484-5.
- JACOBSEN, W., KUHN, B., SOLDNER, A., KIRCHNER, G., SEWING, K. F., KOLLMAN, P. A., BENET, L. Z. & CHRISTIANS, U. (2000) Lactonization is the critical first step in the

disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. *Drug Metab Dispos*, 28, 1369-78.

JIANG, H., ZHANG, L., KOUBI, D., KUO, J., GROG, L., RODRIGUEZ, A. I., HUNTER, T. J., TANG, S., LAZAROVICI, P., GAUTAM, S. C. & LEVINE, R. A. (2005) Roles of Ras-Erk in apoptosis of PC12 cells induced by trophic factor withdrawal or oxidative stress. *J Mol Neurosci*, 25, 133-40.

JIANG, P., DU, W. & WU, M. (2007) p53 and Bad: remote strangers become close friends. *Cell Res*, 17, 283-5.

KANO, M., TAKEMURA, G., MISAO, J., HAYAKAWA, Y., AOYAMA, T., NISHIGAKI, K., NODA, T., FUJIWARA, T., FUKUDA, K., MINATOBUCHI, S. & FUJIWARA, H. (1999) Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation*, 99, 2757-64.

KATOH, K., IKATA, T., KATOH, S., HAMADA, Y., NAKAUCHI, K., SANNO, T. & NIWA, M. (1996) Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neurosci Lett*, 216, 9-12.

KATOH, S., IKATA, T., TSUBO, M., HAMADA, Y. & EL MASRY, W. S. (1997) Possible implication of leukocytes in secondary pathological changes after spinal cord injury. *Injury*, 28, 215-7.

KEANE, R. W., DAVIS, A. R. & DIETRICH, W. D. (2006) Inflammatory and apoptotic signaling after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 23, 335-44.

KEANE, R. W., KRAYDIEH, S., LOTOCKI, G., BETHEA, J. R., KRAJEWSKI, S., REED, J. C. & DIETRICH, W. D. (2001) Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60, 422-9.

KELLER, J. N., MARK, R. J., BRUCE, A. J., BLANC, E., ROTHSTEIN, J. D., UCHIDA, K., WAEG, G. & MATTSON, M. P. (1997) 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience*, 80, 685-96.

KIM, G. M., XU, J., SONG, S. K., YAN, P., KU, G., XU, X. M. & HSU, C. Y. (2001) Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*, 21, 6617-25.

KIRKLAND, R. A. & FRANKLIN, J. L. (2003) Bax, reactive oxygen, and cytochrome c release in neuronal apoptosis. *Antioxid Redox Signal*, 5, 589-96.

KOHLER, C., ORRENIUS, S. & ZHIVOTOVSKY, B. (2002) Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods*, 265, 97-110.

- KRUMAN, I., BRUCE-KELLER, A. J., BREDESEN, D., WAEG, G. & MATTSON, M. P. (1997) Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci*, 17, 5089-100.
- KUREISHI, Y., LUO, Z., SHIOJIMA, I., BIALIK, A., FULTON, D., LEFER, D. J., SESSA, W. C. & WALSH, K. (2000) The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*, 6, 1004-10.
- KWON, B. K., BORISOFF, J. F. & TETZLAFF, W. (2002) Molecular targets for therapeutic intervention after spinal cord injury. *Mol Interv*, 2, 244-58.
- LACROIX, S., CHANG, L., ROSE-JOHN, S. & TUSZYNSKI, M. H. (2002) Delivery of hyper-interleukin-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and macrophage infiltration and inhibits axonal growth. *J Comp Neurol*, 454, 213-28.
- LAUFS, U., GERTZ, K., HUANG, P., NICKENIG, G., BOHM, M., DIRNAGL, U. & ENDRES, M. (2000) Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke*, 31, 2442-9.
- LAUFS, U. & LIAO, J. K. (2000) Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Cardiovasc Med*, 10, 143-8.
- LEE, S. T., CHU, K., PARK, J. E., HONG, N. H., IM, W. S., KANG, L., HAN, Z., JUNG, K. H., KIM, M. W. & KIM, M. (2008) Atorvastatin attenuates mitochondrial toxin-induced striatal degeneration, with decreasing iNOS/c-Jun levels and activating ERK/Akt pathways. *J Neurochem*, 104, 1190-200.
- LEE, Y. B., YUNE, T. Y., BAIK, S. Y., SHIN, Y. H., DU, S., RHIM, H., LEE, E. B., KIM, Y. C., SHIN, M. L., MARKELONIS, G. J. & OH, T. H. (2000a) Role of tumor necrosis factor-alpha in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 166, 190-5.
- LEE, Y. L., SHIH, K., BAO, P., GHIRNIKAR, R. S. & ENG, L. F. (2000b) Cytokine chemokine expression in contused rat spinal cord. *Neurochem Int*, 36, 417-25.
- LEIST, M., FAVA, E., MONTECUCCO, C. & NICOTERA, P. (1997) Peroxynitrite and nitric oxide donors induce neuronal apoptosis by eliciting autocrine excitotoxicity. *Eur J Neurosci*, 9, 1488-98.
- LEIST, M. & NICOTERA, P. (1998) Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res*, 239, 183-201.
- LENNERNAS, H. (2003) Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacokinet*, 42, 1141-60.

- LEWEN, A., MATZ, P. & CHAN, P. H. (2000) Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma*, 17, 871-90.
- LI, G. L., BRODIN, G., FAROOQUE, M., FUNA, K., HOLTZ, A., WANG, W. L. & OLSSON, Y. (1996) Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55, 280-9.
- LI, G. L., FAROOQUE, M., HOLTZ, A. & OLSSON, Y. (1999) Apoptosis of oligodendrocytes occurs for long distances away from the primary injury after compression trauma to rat spinal cord. *Acta Neuropathol*, 98, 473-80.
- LI, M., ONA, V. O., CHEN, M., KAUL, M., TENNETI, L., ZHANG, X., STIEG, P. E., LIPTON, S. A. & FRIEDLANDER, R. M. (2000) Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, 99, 333-42.
- LIU, D. & LI, L. (1995) Prostaglandin F2 alpha rises in response to hydroxyl radical generated in vivo. *Free Radic Biol Med*, 18, 571-6.
- LIU, D., LI, L. & AUGUSTUS, L. (2001) Prostaglandin release by spinal cord injury mediates production of hydroxyl radical, malondialdehyde and cell death: a site of the neuroprotective action of methylprednisolone. *J Neurochem*, 77, 1036-47.
- LIU, D., LING, X., WEN, J. & LIU, J. (2000) The role of reactive nitrogen species in secondary spinal cord injury: formation of nitric oxide, peroxynitrite, and nitrated protein. *J Neurochem*, 75, 2144-54.
- LIU, D., LIU, J. & WEN, J. (1999a) Elevation of hydrogen peroxide after spinal cord injury detected by using the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med*, 27, 478-82.
- LIU, D., SYBERT, T. E., QIAN, H. & LIU, J. (1998) Superoxide production after spinal injury detected by microperfusion of cytochrome c. *Free Radic Biol Med*, 25, 298-304.
- LIU, D., THANGNIPON, W. & MCADOO, D. J. (1991) Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Res*, 547, 344-8.
- LIU, D., XU, G. Y., PAN, E. & MCADOO, D. J. (1999b) Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience*, 93, 1383-9.
- LIU, D., YANG, R., YAN, X. & MCADOO, D. J. (1994) Hydroxyl radicals generated in vivo kill neurons in the rat spinal cord: electrophysiological, histological, and neurochemical results. *J Neurochem*, 62, 37-44.
- LIU, X. Z., XU, X. M., HU, R., DU, C., ZHANG, S. X., MCDONALD, J. W., DONG, H. X., WU, Y. J., FAN, G. S., JACQUIN, M. F., HSU, C. Y. & CHOI, D. W. (1997) Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*, 17, 5395-406.

- LOH, K. P., HUANG, S. H., DE SILVA, R., TAN, B. K. & ZHU, Y. Z. (2006) Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Curr Alzheimer Res*, 3, 327-37.
- LOU, J., LENKE, L. G., LUDWIG, F. J. & O'BRIEN, M. F. (1998) Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, 36, 683-90.
- LU, D., GOUSSEV, A., CHEN, J., PANNU, P., LI, Y., MAHMOOD, A. & CHOPP, M. (2004a) Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 21, 21-32.
- LU, D., MAHMOOD, A., GOUSSEV, A., SCHALLERT, T., QU, C., ZHANG, Z. G., LI, Y., LU, M. & CHOPP, M. (2004b) Atorvastatin reduction of intravascular thrombosis, increase in cerebral microvascular patency and integrity, and enhancement of spatial learning in rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 101, 813-21.
- LU, D., MAHMOOD, A., QU, C., GOUSSEV, A., LU, M. & CHOPP, M. (2004c) Atorvastatin reduction of intracranial hematoma volume in rats subjected to controlled cortical impact. *J Neurosurg*, 101, 822-5.
- LU, J., ASHWELL, K. W. & WAITE, P. (2000) Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 25, 1859-66.
- MALECKI, A., GARRIDO, R., MATTSON, M. P., HENNIG, B. & TOBOREK, M. (2000) 4-Hydroxynonenal induces oxidative stress and death of cultured spinal cord neurons. *J Neurochem*, 74, 2278-87.
- MANN, C. M., LEE, J. H., HILLYER, J., STAMMERS, A. M., TETZLAFF, W. & KWON, B. K. (2010) Lack of robust neurologic benefits with simvastatin or atorvastatin treatment after acute thoracic spinal cord contusion injury. *Exp Neurol*, 221, 285-95.
- MARTIN-VENTURA, J. L., BLANCO-COLIO, L. M., GOMEZ-HERNANDEZ, A., MUNOZ-GARCIA, B., VEGA, M., SERRANO, J., ORTEGA, L., HERNANDEZ, G., TUNON, J. & EGIDO, J. (2005) Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. *Stroke*, 36, 1796-800.
- MAUTES, A. E., WEINZIERL, M. R., DONOVAN, F. & NOBLE, L. J. (2000) Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Phys Ther*, 80, 673-87.
- MCEWEN, M. L. & SPRINGER, J. E. (2005) A mapping study of caspase-3 activation following acute spinal cord contusion in rats. *J Histochem Cytochem*, 53, 809-19.
- MCGRAW, J., HIEBERT, G. W. & STEEVES, J. D. (2001) Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J Neurosci Res*, 63, 109-15.
- MCKERRACHER, L. & HIGUCHI, H. (2006) Targeting Rho to stimulate repair after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 23, 309-17.

- MERRILL, J. E. (1991) Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro. *Dev Neurosci*, 13, 130-7.
- MILLS, C. D., XU, G. Y., MCADOO, D. J. & HULSEBOSCH, C. E. (2001) Involvement of metabotropic glutamate receptors in excitatory amino acid and GABA release following spinal cord injury in rat. *J Neurochem*, 79, 835-48.
- MOSHEIMER, B. A., KANEIDER, N. C., FEISTRITZER, C., DJANANI, A., STURN, D. H., PATSCH, J. R. & WIEDERMANN, C. J. (2005) CD40-ligand-dependent induction of COX-2 gene expression in endothelial cells by activated platelets: inhibitory effects of atorvastatin. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 16, 105-10.
- MOZAFFARIAN, D., MINAMI, E., LETTERER, R. A., LAWLER, R. L., MCDONALD, G. B. & LEVY, W. C. (2005) The effects of atorvastatin (10 mg) on systemic inflammation in heart failure. *Am J Cardiol*, 96, 1699-704.
- MU, X., AZBILL, R. D. & SPRINGER, J. E. (2002) NBQX treatment improves mitochondrial function and reduces oxidative events after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 19, 917-27.
- MUELLER, B. K., MACK, H. & TEUSCH, N. (2005) Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 387-98.
- NAGATA, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-65.
- NAKAHARA, S., YONE, K., SAKOU, T., WADA, S., NAGAMINE, T., NIIYAMA, T. & ICHIJO, H. (1999) Induction of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) after spinal cord injury in rats: possible involvement of ASK1-JNK and -p38 pathways in neuronal apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58, 442-50.
- NESIC, O., XU, G. Y., MCADOO, D., HIGH, K. W., HULSEBOSCH, C. & PEREZ-POL, R. (2001) IL-1 receptor antagonist prevents apoptosis and caspase-3 activation after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 18, 947-56.
- NEWBERN, J., TAYLOR, A., ROBINSON, M., LI, L. & MILLIGAN, C. E. (2005) Decreases in phosphoinositide-3-kinase/Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling activate components of spinal motoneuron death. *J Neurochem*, 94, 1652-65.
- NICOTERA, P. & ORRENIUS, S. (1998) The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*, 23, 173-80.
- NOBLE, L. J., DONOVAN, F., IGARASHI, T., GOUSSEV, S. & WERB, Z. (2002) Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *J Neurosci*, 22, 7526-35.
- OKADA, S., NAKAMURA, M., MIKAMI, Y., SHIMAZAKI, T., MIHARA, M., OHSUGI, Y., IWAMOTO, Y., YOSHIZAKI, K., KISHIMOTO, T., TOYAMA, Y. & OKANO, H. (2004) Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J Neurosci Res*, 76, 265-76.

- ONOSE, G., ANGHELESCU, A., MURESANU, D. F., PADURE, L., HARAS, M. A., CHENDREANU, C. O., ONOSE, L. V., MIREA, A., CIUREA, A. V., EL MASRI, W. S. & VON WILD, K. R. (2009) A review of published reports on neuroprotection in spinal cord injury. *Spinal Cord*, 47, 716-26.
- ORTEGO, M., BUSTOS, C., HERNANDEZ-PRESA, M. A., TUNON, J., DIAZ, C., HERNANDEZ, G. & EGIDO, J. (1999) Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis*, 147, 253-61.
- ORTEGO, M., GOMEZ-HERNANDEZ, A., VIDAL, C., SANCHEZ-GALAN, E., BLANCO-COLIO, L. M., MARTIN-VENTURA, J. L., TUNON, J., DIAZ, C., HERNANDEZ, G. & EGIDO, J. (2005) HMG-CoA reductase inhibitors reduce I kappa B kinase activity induced by oxidative stress in monocytes and vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 45, 468-75.
- OZAWA, H., KEANE, R. W., MARCILLO, A. E., DIAZ, P. H. & DIETRICH, W. D. (2002) Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, 177, 306-13.
- PAN, W., KASTIN, A. J., BELL, R. L. & OLSON, R. D. (1999) Upregulation of tumor necrosis factor alpha transport across the blood-brain barrier after acute compressive spinal cord injury. *J Neurosci*, 19, 3649-55.
- PAN, W., ZHANG, L., LIAO, J., CSERNUS, B. & KASTIN, A. J. (2003) Selective increase in TNF alpha permeation across the blood-spinal cord barrier after SCI. *J Neuroimmunol*, 134, 111-7.
- PANNU, R., BARBOSA, E., SINGH, A. K. & SINGH, I. (2005) Attenuation of acute inflammatory response by atorvastatin after spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res*, 79, 340-50.
- PANNU, R., CHRISTIE, D. K., BARBOSA, E., SINGH, I. & SINGH, A. K. (2007) Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury. *J Neurochem*, 101, 182-200.
- PANTER, S. S., YUM, S. W. & FADEN, A. I. (1990) Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann Neurol*, 27, 96-9.
- PARK, E., VELUMIAN, A. A. & FEHLINGS, M. G. (2004) The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma*, 21, 754-74.
- PETTIGREW, D. B. & CRUTCHER, K. A. (2001) Myelin contributes to the parallel orientation of axonal growth on white matter in vitro. *BMC Neurosci*, 2, 9.
- PFIZER (2009) Lipitor, Prescribing Information.

- PIANI, D., FREI, K., DO, K. Q., CUENOD, M. & FONTANA, A. (1991) Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci Lett*, 133, 159-62.
- PIERMARTIRI, T. C., VANDRESEN-FILHO, S., DE ARAUJO HERCULANO, B., MARTINS, W. C., DAL'AGNOLO, D., STROEH, E., CARQUEJA, C. L., BOECK, C. R. & TASCIA, C. I. (2009) Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res*, 16, 106-15.
- PINEAU, I. & LACROIX, S. (2007) Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol*, 500, 267-85.
- POLSTER, B. M. & FISKUM, G. (2004) Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem*, 90, 1281-9.
- QU, C., LU, D., GOUSSEV, A., SCHALLERT, T., MAHMOOD, A. & CHOPP, M. (2005) Effect of atorvastatin on spatial memory, neuronal survival, and vascular density in female rats after traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 103, 695-701.
- RADULOVIC, L. L., CILLA, D. D., POSVAR, E. L., SEDMAN, A. J. & WHITFIELD, L. R. (1995) Effect of food on the bioavailability of atorvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor. *J Clin Pharmacol*, 35, 990-4.
- RANSOM, R. W. & STEC, N. L. (1988) Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem*, 51, 830-6.
- REGAN, R. F. (1996) The vulnerability of spinal cord neurons to excitotoxic injury: comparison with cortical neurons. *Neurosci Lett*, 213, 9-12.
- RESNICK, D. K., GRAHAM, S. H., DIXON, C. E. & MARION, D. W. (1998) Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 15, 1005-13.
- RESNICK, D. K., NGUYEN, P. & CECHVALA, C. F. (2001) Regional and temporal changes in prostaglandin E2 and thromboxane B2 concentrations after spinal cord injury. *Spine J*, 1, 432-6.
- RIAD, A., DU, J., STIEHL, S., WESTERMANN, D., MOHR, Z., SOBIREY, M., DOEHNER, W., ADAMS, V., PAUSCHINGER, M., SCHULTHEISS, H. P. & TSCHOPE, C. (2007) Low-dose treatment with atorvastatin leads to anti-oxidative and anti-inflammatory effects in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol*, 569, 204-11.
- RICE, T., LARSEN, J., RIVEST, S. & YONG, V. W. (2007) Characterization of the early neuroinflammation after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66, 184-95.

- RODRIGUES, C. L., GONDIM, F. A., LEAL, P. R., CAMURCA, F. D., FREIRE, C. C., DOS SANTOS, A. A. & ROLA, F. H. (2001) Gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid throughout the first month after thoracic spinal cord transection in awake rats. *Dig Dis Sci*, 46, 1604-9.
- ROSENBERG, L. J., TENG, Y. D. & WRATHALL, J. R. (1999) 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline reduces glial loss and acute white matter pathology after experimental spinal cord contusion. *J Neurosci*, 19, 464-75.
- ROUX, P. P., RICHARDS, S. A. & BLENIS, J. (2003) Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. *Mol Cell Biol*, 23, 4796-804.
- SALVEMINI, D., DOYLE, T. M. & CUZZOCREA, S. (2006) Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. *Biochem Soc Trans*, 34, 965-70.
- SANDVIG, A., BERRY, M., BARRETT, L. B., BUTT, A. & LOGAN, A. (2004) Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*, 46, 225-51.
- SANTODOMINGO-GARZON, T., CUNHA, T. M., VERRI, W. A., JR., VALERIO, D. A., PARADA, C. A., POOLE, S., FERREIRA, S. H. & CUNHA, F. Q. (2006) Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception. *Br J Pharmacol*, 149, 14-22.
- SATAKE, K., MATSUYAMA, Y., KAMIYA, M., KAWAKAMI, H., IWATA, H., ADACHI, K. & KIUCHI, K. (2000) Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury. *Brain Res Mol Brain Res*, 85, 114-22.
- SCHACHTER, M. (2005) Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol*, 19, 117-25.
- SCHMEER, C., KRETZ, A. & ISENMANN, S. (2006) Statin-mediated protective effects in the central nervous system: general mechanisms and putative role of stress proteins. *Restor Neurol Neurosci*, 24, 79-95.
- SCHUCHT, P., RAINETEAU, O., SCHWAB, M. E. & FOUAD, K. (2002) Anatomical correlates of locomotor recovery following dorsal and ventral lesions of the rat spinal cord. *Exp Neurol*, 176, 143-53.
- SEKHON, L. H. & FEHLINGS, M. G. (2001) Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*, 26, S2-12.
- SEROU, M. J., DECOSTER, M. A. & BAZAN, N. G. (1999) Interleukin-1 beta activates expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in primary hippocampal neuronal culture: platelet-activating factor as a preferential mediator of cyclooxygenase-2 expression. *J Neurosci Res*, 58, 593-8.

- SEYFRIED, D., HAN, Y., LU, D., CHEN, J., BYDON, A. & CHOPP, M. (2004) Improvement in neurological outcome after administration of atorvastatin following experimental intracerebral hemorrhage in rats. *J Neurosurg*, 101, 104-7.
- SHEN, H. R., LI, Z. D. & ZHONG, M. K. (2006) HPLC assay and pharmacokinetic study of atorvastatin in beagle dogs after oral administration of atorvastatin self-microemulsifying drug delivery system. *Pharmazie*, 61, 18-20.
- SHIRAYA, S., MIYAKE, T., AOKI, M., YOSHIKAZU, F., OHGI, S., NISHIMURA, M., OGIHARA, T. & MORISHITA, R. (2009) Inhibition of development of experimental aortic abdominal aneurysm in rat model by atorvastatin through inhibition of macrophage migration. *Atherosclerosis*, 202, 34-40.
- SHUMAN, S. L., BRESNAHAN, J. C. & BEATTIE, M. S. (1997) Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res*, 50, 798-808.
- SIEMS, W. G., HAPNER, S. J. & VAN KUIJK, F. J. (1996) 4-hydroxynonenal inhibits Na(+)-K(+)-ATPase. *Free Radic Biol Med*, 20, 215-23.
- SINGH, U., DEVARAJ, S., JIALAL, I. & SIEGEL, D. (2008) Comparison effect of atorvastatin (10 versus 80 mg) on biomarkers of inflammation and oxidative stress in subjects with metabolic syndrome. *Am J Cardiol*, 102, 321-5.
- SOLA, S., MIR, M. Q., LERAKIS, S., TANDON, N. & KHAN, B. V. (2006) Atorvastatin improves left ventricular systolic function and serum markers of inflammation in nonischemic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 47, 332-7.
- SOTIRIOU, C. G. & CHENG, J. W. (2000) Beneficial effects of statins in coronary artery disease--beyond lowering cholesterol. *Ann Pharmacother*, 34, 1432-9.
- SPRINGER, J. E., AZBILL, R. D. & KNAPP, P. E. (1999) Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med*, 5, 943-6.
- SPRINGER, J. E., AZBILL, R. D., MARK, R. J., BEGLEY, J. G., WAEG, G. & MATTSON, M. P. (1997) 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, rapidly accumulates following traumatic spinal cord injury and inhibits glutamate uptake. *J Neurochem*, 68, 2469-76.
- SPRINGER, J. E., AZBILL, R. D., NOTTINGHAM, S. A. & KENNEDY, S. E. (2000) Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*, 20, 7246-51.
- SRIBNICK, E. A., MATZELLE, D. D., BANIK, N. L. & RAY, S. K. (2007) Direct evidence for calpain involvement in apoptotic death of neurons in spinal cord injury in rats and neuroprotection with calpain inhibitor. *Neurochem Res*, 32, 2210-6.
- STUMPF, C., PETZI, S., SEYBOLD, K., WASMEIER, G., ARNOLD, M., RAAZ, D., YILMAZ, A., DANIEL, W. G. & GARLICH, C. D. (2009) Atorvastatin enhances

interleukin-10 levels and improves cardiac function in rats after acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*, 116, 45-52.

SUGAWARA, T., AYER, R., JADHAV, V., CHEN, W., TSUBOKAWA, T. & ZHANG, J. H. (2008a) Simvastatin attenuation of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats via increased phosphorylation of Akt and endothelial nitric oxide synthase. *J Neurosci Res*, 86, 3635-43.

SUGAWARA, T., JADHAV, V., AYER, R. & ZHANG, J. (2008b) Simvastatin attenuates cerebral vasospasm and improves outcomes by upregulation of PI3K/Akt pathway in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*, 102, 391-4.

SUGIYAMA, M., OHASHI, M., TAKASE, H., SATO, K., UEDA, R. & DOHI, Y. (2005) Effects of atorvastatin on inflammation and oxidative stress. *Heart Vessels*, 20, 133-6.

SUNG, J. K., MIAO, L., CALVERT, J. W., HUANG, L., LOUIS HARKEY, H. & ZHANG, J. H. (2003) A possible role of RhoA/Rho-kinase in experimental spinal cord injury in rat. *Brain Res*, 959, 29-38.

TAKEBAYASHI, K., MATSUMOTO, S., WAKABAYASHI, S., INUKAI, Y., MATSUTOMO, R., ASO, Y. & INUKAI, T. (2005) The effect of low-dose atorvastatin on circulating monocyte chemoattractant protein-1 in patients with type 2 diabetes complicated by hyperlipidemia. *Metabolism*, 54, 1225-9.

TANIMOTO, A., MURATA, Y., WANG, K. Y., TSUTSUI, M., KOHNO, K. & SASAGURI, Y. (2008) Monocyte chemoattractant protein-1 expression is enhanced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor via Jak2-Stat5 signaling and inhibited by atorvastatin in human monocytic U937 cells. *J Biol Chem*, 283, 4643-51.

TAOKA, Y. & OKAJIMA, K. (1998) Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol*, 56, 341-58.

TAOKA, Y. & OKAJIMA, K. (2000) Role of leukocytes in spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, 17, 219-29.

TAOKA, Y., OKAJIMA, K., MURAKAMI, K., JOHNO, M. & NARUO, M. (1998) Role of neutrophil elastase in compression-induced spinal cord injury in rats. *Brain Res*, 799, 264-9.

TAOKA, Y., OKAJIMA, K., UCHIBA, M., MURAKAMI, K., HARADA, N., JOHNO, M., NARUO, M., OKABE, H. & TAKATSUKI, K. (1997) Reduction of spinal cord injury by administration of iloprost, a stable prostacyclin analog. *J Neurosurg*, 86, 1007-11.

TATOR, C. H. (1995) Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol*, 5, 407-13.

TATOR, C. H. & FEHLINGS, M. G. (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*, 75, 15-26.

- TATOR, C. H. & KOYANAGI, I. (1997) Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J Neurosurg*, 86, 483-92.
- TEMPEL, G. E. & MARTIN, H. F., 3RD (1992) The beneficial effects of a thromboxane receptor antagonist on spinal cord perfusion following experimental cord injury. *J Neurol Sci*, 109, 162-7.
- TENNETI, L. & LIPTON, S. A. (2000) Involvement of activated caspase-3-like proteases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem*, 74, 134-42.
- THER, M. L. D. (1997) Atorvastatin--a new lipid-lowering drug. *Med Lett Drugs Ther*, 39, 29-31.
- THURET, S., MOON, L. D. & GAGE, F. H. (2006) Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*, 7, 628-43.
- TONAI, T., SHIBA, K., TAKETANI, Y., OHMOTO, Y., MURATA, K., MURAGUCHI, M., OHSAKI, H., TAKEDA, E. & NISHISHO, T. (2001) A neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) reduces neurologic damage after spinal cord injury in rats. *J Neurochem*, 78, 1064-72.
- TONAI, T., TAKETANI, Y., OHMOTO, Y., UEDA, N., NISHISHO, T. & YAMAMOTO, S. (2002) Cyclooxygenase-2 induction in rat spinal cord injury mediated by proinflammatory tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *Adv Exp Med Biol*, 507, 397-401.
- TONAI, T., TAKETANI, Y., UEDA, N., NISHISHO, T., OHMOTO, Y., SAKATA, Y., MURAGUCHI, M., WADA, K. & YAMAMOTO, S. (1999) Possible involvement of interleukin-1 in cyclooxygenase-2 induction after spinal cord injury in rats. *J Neurochem*, 72, 302-9.
- TSURUTA, F., SUNAYAMA, J., MORI, Y., HATTORI, S., SHIMIZU, S., TSUJIMOTO, Y., YOSHIOKA, K., MASUYAMA, N. & GOTOH, Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J*, 23, 1889-99.
- TURKOGULU, O. F., EROGLU, H., OKUTAN, O., GURCAN, O., BODUR, E., SARGON, M. F., ONER, L. & BESKONAKLI, E. (2009) Atorvastatin efficiency after traumatic brain injury in rats. *Surg Neurol*, 72, 146-52; discussion 152.
- VANEGAS, H. & SCHAIBLE, H. G. (2001) Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord. *Prog Neurobiol*, 64, 327-63.
- VOGT, M., BAUER, M. K., FERRARI, D. & SCHULZE-OSTHOFF, K. (1998) Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells. *FEBS Lett*, 429, 67-72.

- WADA, S., YONE, K., ISHIDOU, Y., NAGAMINE, T., NAKAHARA, S., NIIYAMA, T. & SAKOU, T. (1999) Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventative effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurosurg*, 91, 98-104.
- WAEHRE, T., DAMAS, J. K., GULLESTAD, L., HOLM, A. M., PEDERSEN, T. R., ARNESEN, K. E., TORSVIK, H., FROLAND, S. S., SEMB, A. G. & AUKRUST, P. (2003) Hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors down-regulate chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 41, 1460-7.
- WAGNER, A. H., SCHWABE, O. & HECKER, M. (2002) Atorvastatin inhibition of cytokine-inducible nitric oxide synthase expression in native endothelial cells in situ. *Br J Pharmacol*, 136, 143-9.
- WANG, C. X., NUTTIN, B., HEREMANS, H., DOM, R. & GYBELS, J. (1996) Production of tumor necrosis factor in spinal cord following traumatic injury in rats. *J Neuroimmunol*, 69, 151-6.
- WANG, C. X., OLSCHOWKA, J. A. & WRATHALL, J. R. (1997) Increase of interleukin-1beta mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat. *Brain Res*, 759, 190-6.
- WANG, H., LYNCH, J. R., SONG, P., YANG, H. J., YATES, R. B., MACE, B., WARNER, D. S., GUYTON, J. R. & LASKOWITZ, D. T. (2007) Simvastatin and atorvastatin improve behavioral outcome, reduce hippocampal degeneration, and improve cerebral blood flow after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 206, 59-69.
- WASSMANN, S., LAUFS, U., MULLER, K., KONKOL, C., AHLBORY, K., BAUMER, A. T., LINZ, W., BOHM, M. & NICKENIG, G. (2002) Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 300-5.
- WIKLUND, O., MATTSSON-HULTEN, L., HURT-CAMEJO, E. & OSCARSSON, J. (2002) Effects of simvastatin and atorvastatin on inflammation markers in plasma. *J Intern Med*, 251, 338-47.
- WINTON, M. J., DUBREUIL, C. I., LASKO, D., LECLERC, N. & MCKERRACHER, L. (2002) Characterization of new cell permeable C3-like proteins that inactivate Rho and stimulate neurite outgrowth on inhibitory substrates. *J Biol Chem*, 277, 32820-9.
- WRATHALL, J. R., BOUZOUKIS, J. & CHOINIÈRE, D. (1992a) Effect of kynurenate on functional deficits resulting from traumatic spinal cord injury. *Eur J Pharmacol*, 218, 273-81.
- WRATHALL, J. R., CHOINIÈRE, D. & TENG, Y. D. (1994) Dose-dependent reduction of tissue loss and functional impairment after spinal cord trauma with the AMPA/kainate antagonist NBQX. *J Neurosci*, 14, 6598-607.

- WRATHALL, J. R., TENG, Y. D., CHOINIERE, D. & MUNDT, D. J. (1992b) Evidence that local non-NMDA receptors contribute to functional deficits in contusive spinal cord injury. *Brain Res*, 586, 140-3.
- WRATHALL, J. R., TENG, Y. D. & MARRIOTT, R. (1997) Delayed antagonism of AMPA/kainate receptors reduces long-term functional deficits resulting from spinal cord trauma. *Exp Neurol*, 145, 565-73.
- XIONG, Y., RABCHEVSKY, A. G. & HALL, E. D. (2007) Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J Neurochem*, 100, 639-49.
- XU, J., FAN, G., CHEN, S., WU, Y., XU, X. M. & HSU, C. Y. (1998) Methylprednisolone inhibition of TNF-alpha expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 59, 135-42.
- XU, Z. M., ZHAO, S. P., LI, Q. Z., NIE, S. & ZHOU, H. N. (2003) Atorvastatin reduces plasma MCP-1 in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*, 338, 17-24.
- YAKOVLEV, A. G. & FADEN, A. I. (1994) Sequential expression of c-fos protooncogene, TNF-alpha, and dynorphin genes in spinal cord following experimental traumatic injury. *Mol Chem Neuropathol*, 23, 179-90.
- YANG, L., BLUMBERGS, P. C., JONES, N. R., MANAVIS, J., SARVESTANI, G. T. & GHABRIEL, M. N. (2004) Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in human traumatic spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*, 29, 966-71.
- YANG, L., JONES, N. R., BLUMBERGS, P. C., VAN DEN HEUVEL, C., MOORE, E. J., MANAVIS, J., SARVESTANI, G. T. & GHABRIEL, M. N. (2005) Severity-dependent expression of pro-inflammatory cytokines in traumatic spinal cord injury in the rat. *J Clin Neurosci*, 12, 276-84.
- YIN, K. J., KIM, G. M., LEE, J. M., HE, Y. Y., XU, J. & HSU, C. Y. (2005) JNK activation contributes to DP5 induction and apoptosis following traumatic spinal cord injury. *Neurobiol Dis*, 20, 881-9.
- YIU, G. & HE, Z. (2006) Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci*, 7, 617-27.
- YUNE, T. Y., CHANG, M. J., KIM, S. J., LEE, Y. B., SHIN, S. W., RHIM, H., KIM, Y. C., SHIN, M. L., OH, Y. J., HAN, C. T., MARKELONIS, G. J. & OH, T. H. (2003) Increased production of tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, 20, 207-19.
- YUNE, T. Y., LEE, J. Y., JIANG, M. H., KIM, D. W., CHOI, S. Y. & OH, T. H. (2008) Systemic administration of PEP-1-SOD1 fusion protein improves functional recovery by inhibition of neuronal cell death after spinal cord injury. *Free Radic Biol Med*, 45, 1190-200.

- ZACCO, A., TOGO, J., SPENCE, K., ELLIS, A., LLOYD, D., FURLONG, S. & PISER, T. (2003) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci*, 23, 11104-11.
- ZARGHI, A., SHAFATI, A., FOROUTAN, S. M. & KHODDAM, A. (2005) A simple and rapid HPLC method for the determination of atorvastatin in human plasma with UV detection and its application to pharmacokinetic studies. *Arzneimittelforschung*, 55, 451-4.
- ZHENG, X., CUI, X. X., AVILA, G. E., HUANG, M. T., LIU, Y., PATEL, J., KONG, A. N., PAULINO, R., SHIH, W. J., LIN, Y., RABSON, A. B., REDDY, B. S. & CONNEY, A. H. (2007) Atorvastatin and celecoxib inhibit prostate PC-3 tumors in immunodeficient mice. *Clin Cancer Res*, 13, 5480-7.

Webographie

NSCISC : *National Spinal Cord Injury Statistical Center*

https://www.nscisc.uab.edu/public_content/facts_figures_2009.aspx

Visité le 14 Janvier 2010

NCIPC : *National Center for Injury Prevention and Control*

<http://www.cdc.gov/Ncipc/factsheets/scifacts.htm>

Visité le 15 Avril 2010

Christopher & Dana Reeve Foundation – Rat Spinal Cord Atlas

http://www.christopherreeve.org/site/c.ddJFKRNoFiG/b.4819993/k.4888/Spinal_Cord_Atlas_Rat_Spinal_Cord.htm

Visité le 10 Aout 2010