

ABSENCE D'EFFET PROTECTEUR DU CANDESARTAN ET DE L'ANGIOTENSINE IV DANS LE TRAUMATISME CRÂNIEN MODÉRÉ CHEZ LE RAT

Mohamad Nasser, Laurent Botelle, James Javellaud, Nicole Oudart et Jean-Michel Achard¹

EA 3842, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Institut Fédératif de Recherche 145,
Université de Limoges, Limoges, France

¹Laboratoire de Physiologie, Faculté de Médecine, 2 rue du Dr Marcland, 87000 Limoges,
France

jean-michel.achard@unilim.fr

(Received 19 October 2011 - Accepted 12 December 2011)

RÉSUMÉ

Rationnel : les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ara2s) sont protecteurs dans de nombreux modèles expérimentaux d'accident vasculaire cérébral ischémique. Cet effet protecteur repose sur la stimulation des récepteurs non-at1 par l'angiotensine II et l'angiotensine IV. Puisque le traumatisme crânien partage avec l'ischémie cérébrale plusieurs mécanismes communs, on a examiné si un prétraitement par un ara2, le candésartan, ou un post-traitement par l'angiotensine IV sont aussi protecteurs dans un modèle de traumatisme crânien fermé chez le rat.

Méthodes : des rats sprague-dawley adultes ont été traités pendant 5 jours par le candésartan (0,5 mg/kg/j) ou le véhicule (solution isotonique de NaCl) par gavage avant la réalisation d'un traumatisme crânien modéré par impact-accélération. Deux autres groupes de rats ont été traités par une injection intrapéritonéale quotidienne d'angiotensine IV (1,5 mg/kg) ou le véhicule pendant 5 jours après le traumatisme. L'atteinte neurologique globale a été évaluée par la mesure quotidienne du score neurologique. Les déficits sensitifs (test du scotch) et sensorimoteurs (test de la poutre) ont été évalués quotidiennement de j1 à j7 et à j15; le déficit cognitif (test de reconnaissance d'objet) a été évalué à j15.

Résultats: le traumatisme a entraîné des déficits sensitifs et sensorimoteurs significatifs à j1, s'atténuant spontanément dans le temps. À j15, les animaux traumatisés présentaient une altération significative de leur mémoire de travail. Les traitements par le candésartan ou par l'angiotensine IV n'ont ni diminué la sévérité des déficits sensorimoteurs initiaux, ni n'ont accéléré leur récupération. Le candésartan et l'angiotensine IV n'avaient pas d'effets sur le déficit cognitif consolidé à j15.

Conclusion: le prétraitement par le candésartan et le post-traitement par l'angiotensine IV ne protègent pas des déficits sensorimoteurs et cognitifs dans un modèle de traumatisme crânien par impact-accélération chez le rat.

Mots-clés: traumatisme crânien, impact-accélération, antagonistes des récepteurs de l'angiotensine, angiotensine IV

ABSTRACT

Background : angiotensin receptor blockers (ARB) are protective in various models of experimental ischemic stroke. This protective effect is mediated by the stimulation of non-AT1 receptors by angiotensin II and angiotensin IV. Since traumatic brain injury shares with ischemic cerebral injury several common mechanisms, we examined if a pretreatment with the ARB candesartan, or a post-treatment with angiotensin IV are also protective in a rat model of blunt traumatic brain injury (TBI).

Methods : adults Sprague Dawley rats were treated for five days with candesartan (0.5 mg/kg/day) or saline by gavage prior to the induction of diffuse moderate TBI using the impact-acceleration model. Two others groups of rats were treated by a daily intraperitoneal injection of angiotensin IV (1.5 mg/kg/day) or saline for five days following TBI. Overall neurological insult were assessed daily by measuring the neurological score. Sensitive deficits (scotch test) and sensorimotor deficits (beam-walking test) were evaluated daily from day 1 to 7 and at day 15; cognitive impairment (object recognition test) was evaluated at day 15.

Results : TBI induced significant sensitive and sensorimotor deficits that were maximal at day 1 and spontaneously improved with time. At day 15, traumatised animals had a marked alteration of the working memory. Neither treatment with candesartan, angiotensin IV or with erythropoietin decreased the severity of the initial sensorimotor deficits, nor accelerate the recovery rate. Candesartan, angiotensin IV had likewise no protective effect on the cognitive deficit evaluated to day 15.

Conclusion: pretreatment with candesartan and post-treatment with angiotensin IV are both ineffective to protect against sensorimotor and cognitive impairment in a rat model of impact-acceleration TBI.

Keywords: traumatic brain injury, impact-acceleration, angiotensin receptor blockers, angiotensin IV

INTRODUCTION

Les traumatismes crâniens (TC) représentent une cause majeure de mortalité et de handicap du sujet jeune, en raison de séquelles motrices et cognitives (Tagliaferri *et al.*, 2006). A ce jour, aucun traitement n'a pu faire la preuve clinique de son efficacité pour réduire la mortalité, minimiser les séquelles chez les survivants ou accélérer la récupération post traumatique (Beauchamp *et al.*, 2008).

La pathophysiologie du TC est complexe, et repose sur l'activation de nombreuses voies qui concourent à la genèse des lésions cérébrales. Le traumatisme initial déclenche une réponse inflammatoire, un stress oxydatif, un déséquilibre ionique, une altération de la fonction mitochondriale, une augmentation de la perméabilité vasculaire, une atteinte neuronale par excitotoxicité. Ces processus, intriqués, sont responsables d'un oedème cérébral et d'une augmentation de la pression intracrânienne qui compromettent la perfusion cérébrale, augmentent la mortalité neuronale, la taille de l'infarctus, et conduisent aux déficits sensitifs, moteurs et cognitifs (Werner & Engelhard, 2007). La cascade de phénomènes délétères observée au cours du TC est par bien des aspects très comparable à celle observée au cours de l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique. En dépit d'un investissement considérable en travaux de recherche, aucun traitement n'est à ce jour disponible pour limiter les conséquences dévastatrices de l'AVC et du TC. De très nombreuses molécules se sont

montrées efficaces pour limiter l'inflammation, la réaction oxydative ou l'apoptose neuronale dans des modèles expérimentaux précliniques, mais aucun des agents dont le développement a pu être conduit jusqu'aux essais cliniques n'a pu à ce jour faire la preuve de son efficacité chez l'homme (Ginsberg, 2008; Schouten, 2007).

Malgré ce contexte pessimiste, la recherche de nouvelles voies de protection potentielles visant à limiter les conséquences d'une lésion cérébrale aigue, ischémique ou traumatique, reste active. Parmi les nouvelles pistes, l'utilisation des sartans, les antagonistes du récepteur AT1 de l'angiotensine II ou AT1 récepteur bloqueurs (ARBs), pourraient offrir des perspectives intéressantes (Oprisiu-Fournier *et al.*, 2009).

Cette classe de médicaments, développés et largement prescrits comme antihypertenseurs, est apparue efficace pour limiter les conséquences de l'AVC ischémique chez le rat, la souris et la gerbille dans différents modèles d'ischémie cérébrale (Dalmay *et al.*, 2001; Engelhorn *et al.*, 2004; Groth *et al.*, 2003; Lou *et al.*, 2004; Miyamoto *et al.*, 2008). En bloquant le récepteur AT1 responsable des effets presseurs de l'angiotensine II, les sartans inhibent le rétrocontrôle négatif de l'angiotensine II sur la rénine, et augmentent ainsi les taux circulants de l'hormone.

Les effets neuroprotecteurs de l'angiotensine apparaissent être médiés par la stimulation de son récepteur alternatif, AT2 (Iwai *et al.*, 2004; Iwanami *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2005), et par le peptide plus court issu de son métabolisme, l'angiotensine IV par le biais de son récepteur spécifique AT4 (Faure *et al.*, 2006; 2008). L'intérêt potentiel des sartans est qu'à l'inverse de molécules neuroprotectrices jusqu'à présent développées, ils ne ciblent pas un maillon précis de la cascade de modifications induites par l'agression cérébrale mais semblent agir de façon pléiotrope, les angiotensines apparaissant comme les acteurs physiologiques de la réponse protectrice qu'ils permettent d'amplifier (Achard *et al.*, 2001; Magy *et al.*, 2005). Alors que l'effet protecteur des sartans dans des modèles d'ischémie cérébrale est largement documenté, leur intérêt éventuel dans le traumatisme crânien n'a jamais été évalué. Le but de cette étude était donc d'étudier si un prétraitement par un sartan, et/ou un post-traitement par l'angiotensine IV protège des déficits sensorimoteurs et cognitifs induits par un traumatisme crânien fermé modéré chez le rat.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux

Des rats adultes mâles Sprague Dawley (350-400 g) (centre d'élevage Dépré, France) sont maintenus à l'animalerie, en respectant une alternance jour/ nuit (12h/12h). Ils disposent de nourriture et de boisson à volonté; toutes les expérimentations sont conformes à l'éthique de l'expérimentation animale de la communauté européenne et sont approuvées par le Ministère de l'Agriculture (N° de l'agrément: A87638).

Traumatisme crânien par impact-accelération

Le jour du traumatisme, les rats sont placés dans une cage à induction d'anesthésie (5% isoflurane, 95% air). Une fois anesthésiés, ils sont intubés à l'aide d'un cathéter (TERUMO 14 G, 2×45 mm). La ventilation et l'anesthésie sont alors maintenues par un respirateur (®SAR-830, BIOSEB). Après rasage, une incision est réalisée afin d'exposer le

périoste qui couvre le sommet du crâne. Une pièce métallique de 2 mm d'épaisseur et de 10 mm de diamètre est fixée (colle cyanoacrylate) entre les sutures coronales et lambdoïdes. Puis les animaux sont placés sur un matelas mousse avant de subir le traumatisme crânien.

L'impact est réalisé sur le sommet du crâne au centre de la pièce en laissant tomber un poids d'une hauteur prédéterminée, selon la technique décrite par Marmarou (1994). L'impacteur est constitué d'un tube vertical en plastique de 14 mm de diamètre attaché au mur et d'un système de fil métallique et de poulie permettant à un cylindre métallique (11 mm de diamètre, 48,5 cm de long, pesant 430 g) de tomber d'une hauteur de 1,9 m. Lors de l'impact, l'animal est encore intubé mais on arrête l'anesthésie et la ventilation. Immédiatement après l'impact, les animaux sont replacés sous ventilation et anesthésie, puis cette dernière est arrêtée au bout de cinq minutes. Après vérification de l'absence de fracture, la pièce est enlevée et la plaie est suturée. La ventilation est maintenue jusqu'au réveil de l'animal.

Protocoles et traitements

L'étude comporte un lot témoin (rats non traumatisés et non traités) (n= 6), et 4 lots de rats subissant le traumatisme crânien et recevant soit un prétraitement soit un post-traitement (Fig. 1).

- Rats subissant un prétraitement pendant 5 jours avant le traumatisme crânien:

1^{er} lot: contrôle. Traitement par gavage avec 1 ml d'eau/jour, (TRAUMA 1, n=11).

2^{ème} lot: traitement par gavage avec du candésartan cilexetil (0,5mg/ kg /jour), (CAND, n=11).

- Rats subissant un post-traitement :

3^{ème} lot: contrôle. Traitement avec du soluté physiologique (NaCl 0,15M) en injection intrapéritonéale (IP) pendant 5 jours après le traumatisme crânien, (TRAUMA 2, n=8).

4^{ème} lot: traitement par l'angiotensine IV en IP (1,5 mg/kg/jour) pendant 5 jours après le traumatisme crânien, (ANG IV, n=10).

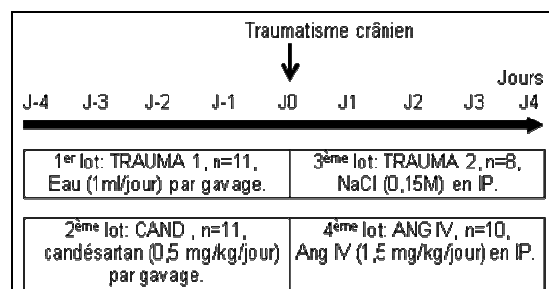


Figure 1. Chronologie des traitements sur les différents lots de rats subissant le traumatisme crânien.

Mesure de la pression artérielle

La pression artérielle (PA) systolique de chaque rat est mesurée pour chaque lot à la fin des traitements (juste avant le choc pour les rats prétraités et le 4e jour après le traumatisme pour les rats post-traités). La PA est mesurée par une méthode indirecte, non

invasive, sur la queue de rat (Tail-cuff). Les rats étant maintenus anesthésiés sous isoflurane (2% dans l'air), on effectue 3 à 5 mesures consécutives avec un intervalle de 2 minutes. Les données sont enregistrées par un système d'acquisition des données couplé à un microordinateur (PowerLab, AD Instruments; Australie).

Score neurologique

Le score neurologique est évalué quotidiennement de J1 à J8 après le choc, puis à J15 pour chaque animal. Les anomalies neurologiques sont évaluées selon l'échelle de 0 à 8 proposée par Germano *et al.* (1994), et présentée dans le Tableau 1.

Un score de 1 ou 2 correspond à des lésions légères, un score de 2 à 4 à des lésions modérées, et un score de 5 à 8 à des lésions sévères.

TABLEAU 1

Échelle des Scores Neurologiques (d'après Germano *et al.*, 1994)

Tests neurologiques	Score
- Tests moteurs	
Le rat est suspendu par la queue	
Flexion des pattes antérieures	1
Flexion des pattes postérieures	1
Le rat est posé sur le sol	
Marche normale	0
Incapable de marcher droit	1
Tourne vers un côté	2
Tombe vers un côté	3
- Etudes des réflexes et mouvements anormaux	
Absence de réflexe cornéen (clignement lorsque la cornée est légèrement touchée par un coton)	1
Absence de réflexe au bruit (réponse motrice à un bruit bref)	1
Crise myoclonique, myodystonie	1
Score maximal	8

Evaluation des performances sensori-motrices

- Test du scotch

Le principe consiste à appliquer successivement sur chaque patte un morceau de papier adhésif (Plasto) de 1,2 cm de largeur autour de la patte antérieure au niveau de la région distale du radius (Komotar *et al.*, 2007). On chronomètre le temps pendant lequel le rat

essaye d'enlever le papier adhésif. On réalise 5 essais de 30 secondes chacun par jour et pour chaque patte; la moyenne des 2 meilleurs temps est prise en compte pour les calculs statistiques. Tous les animaux sont évalués au jour (J-1) avant le traumatisme, puis selon les protocoles ci-dessous:

- en prétraitement : à J+1, J+5 et J+7.
- en post-traitement : à J+1, J+3, J+7 et J+15.

- Test de marche sur une poutre

Le test de marche sur une poutre (Beam Walking Test) permet d'évaluer les performances sensori-motrices des animaux en examinant leur capacité à rester en équilibre et à marcher sur une poutre de 2 m de long et 3 cm de large. La poutre est fixée à 80 cm du sol. L'aire de départ est composée d'une plate-forme de 30 cm de côté surplombée d'une lampe de 50W produisant une lumière aversive. L'aire d'arrivée se compose d'une boîte noire de 30 cm de côté pouvant accueillir le rat, lui permettant ainsi de se cacher de la lumière. Les animaux sont tout d'abord soumis à une phase d'apprentissage qui dure 3 jours à raison de 3 essais par jour avant le traumatisme. Puis les sessions sont réalisées quotidiennement après le traumatisme crânien de J1 à J7 et à J15. Chaque session comprend 3 essais consécutifs. Entre chaque essai, l'animal est placé 1 minute dans la boîte. Les performances des animaux sont évaluées grâce à une échelle de score empruntée à Korenova *et al.* (2009) (Tableau 2). Les scores de latence (temps mis à traverser la poutre) et de fautes au niveau de la coordination motrice (patte dans le vide, chute) correspondent aux moyennes mesurées sur trois essais consécutifs. Un score total de 0 indique une grande facilité dans l'exécution de la tâche alors qu'un score de 10 signifie que l'animal est incapable de l'accomplir.

TABLEAU 2

Echelle des Scores d'Évaluation des Performances Sensori-Motrices; la Valeur Retenue Est Obtenue en Faisant la Somme des Deux Scores (d'après Korenova *et al.*, 2009)

Latence (s)	Score	Nombre de fautes moyenne de 3 essais	Score
≤4	0	≤ 1	0
>4 et ≤ 8	1	>1 et ≤ 2	1
>8 et ≤ 12	2	>2 et ≤ 3	2
>12 et ≤ 20	3	>3 et ≤ 5	3
>20	4	>5 et ≤ 8	4
l'animal n'est pas capable de réaliser la tâche	5	> 8 ou l'animal n'est pas capable de réaliser la tâche	5

Evaluation des performances cognitives : test de reconnaissance d'objet (object recognition test)

Il a pour but d'évaluer la mémoire à court terme (Ennaceur & Delacour, 1988). Ce test consiste à mettre l'animal dans un espace calibré (80-80-40 cm) en présence de deux objets identiques puis différents et d'observer son comportement. Tout d'abord on place l'animal seul dans l'espace pour qu'il s'habitue à ce nouvel environnement pendant 5 min. Ensuite l'animal est exposé à 2 objets identiques F1 et F2 (Duplo) pendant 5 minutes. Après 5 minutes de repos (le rat étant remis dans sa cage), l'un des deux objets identiques (F1 ou F2) est remplacé par un nouvel objet (N) qui a une couleur et une forme différentes. On chronomètre alors le temps passé par le rat à explorer chaque objet: sentir ou toucher l'objet avec le museau. Le ratio de temps passé à explorer le nouvel objet sur le temps passé à explorer l'objet familier est un indice de la mémoire à court terme (N/F). Ce test est réalisé le 15ème jour après le traumatisme.

Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard (ESM); une analyse de variance est utilisée (Anova). Si une valeur significative de F est trouvée, le test de Bonferroni/Dunn est utilisé pour déterminer les différences significatives. Dans tous les tests un niveau de probabilité $p < 0,05$ est considéré comme significatif.

Réactifs

L'isoflurane (AErraneR) est fourni par Baxter (Maurepas, France), l'angiotensine IV (3-8) est fournie par NeoMPS (Strasbourg ; France), le candésartan cilexetil est fourni par AstraZeneca (Reims ; France).

RÉSULTATS

Effets des traitements par le candésartan et l'Ang IV sur la mesure de la pression artérielle (PA)

Les mesures de PA systolique à J0 avant le traumatisme montrent une diminution significative de la PA chez les rats traités par le candésartan comparativement aux témoins [CAND 81 ± 4 mm Hg (n=11) *versus* TEMOIN 110 ± 2 mm Hg (n=6); $p < 0,05$].

En fin de post-traitement par l'angiotensine IV, la PA est significativement augmentée comparativement à celle des rats traumatisés non traités [ANG IV 120 ± 3 mm Hg (n=10) *versus* TRAUMA 2 : 94 ± 5 mm Hg (n=8) $p < 0,05$].

Effets des traitements par le candésartan et l'Ang IV sur le score neurologique

Des déficits neurologiques modérés se manifestent après le traumatisme crânien avec un score neurologique moyen de 2 sur une échelle de 0 à 8, comparable pour tous les groupes. Ils sont maximaux le premier jour après le choc, puis diminuent progressivement (Fig. 2).

Les différents traitements, candésartan et Ang IV ne montrent aucun effet neuroprotecteur, (pas de différence significative entre les lots de rats traités et leurs contrôles respectifs TRAUMA 1 et 2).

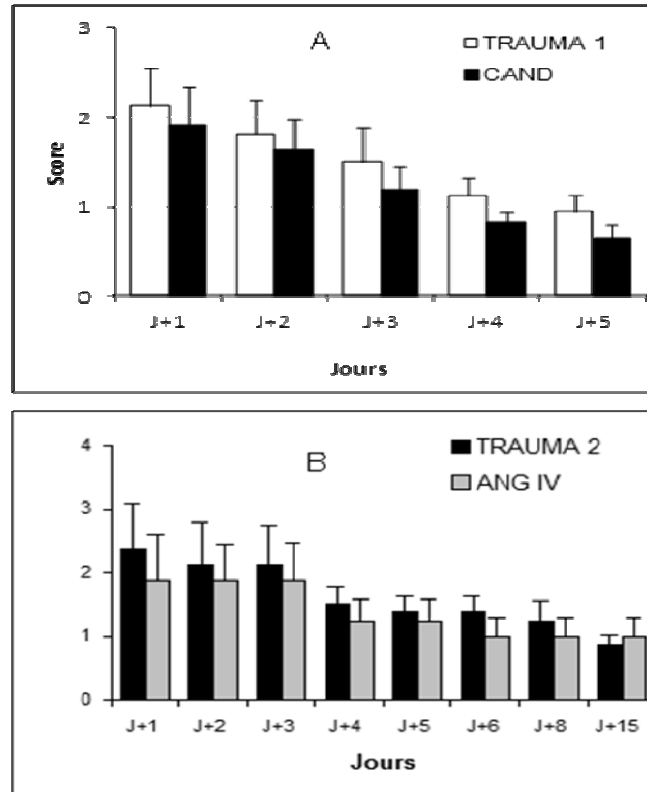


Figure 2. Score neurologique. A: effet du prétraitement par le candésartan. B: effet du post traitement par l'angiotensine IV. Le score normal est de 0, le score maximal de déficits est égal à 8. Différence non significative entre CAND (n=11) versus TRAUMA 1 (n=11) et ANG IV (n=10) versus TRAUMA 2 (n= 8).

Effets des traitements par le candésartan et l'Ang IV sur les performances sensori-motrices

- Test du scotch

Le traumatisme crânien induit une diminution de la sensibilité au niveau des pattes antérieures chez le rat. Cette diminution est importante au premier jour après le traumatisme; les jours suivants les animaux récupèrent progressivement et une semaine après, les rats ont retrouvé la totalité de leur sensibilité. Les résultats, dans tous les groupes, sont strictement comparables entre la patte droite et la patte gauche. La Figure 3 rapporte les résultats obtenus pour la moyenne des deux pattes.

Les performances des animaux témoins ont été étudiées en leur faisant passer les mêmes tests que les lots de rats traumatisés traités ou non par le candésartan.

Pendant la phase de récupération, les données statistiques montrent à J+1 et à J+5 une différence significative entre le lot TEMOIN (n=6) *versus* TRAUMA 1 (n=11) ou *versus* CAND (n=11), ($p < 0,001$ pour J+1; $p < 0,05$ pour J+5) (Fig. 3A).

Le candésartan en prétraitement et l'Ang IV en post-traitement ne préviennent pas la diminution de sensibilité observée après le traumatisme et n'accélèrent pas la récupération spontanée (CAND *versus* TRAUMA 1, ns ; ANG IV *versus* TRAUMA 2, ns) (Fig. 3A et B).

- Test de marche sur une poutre

Ces résultats montrent une altération maximale des capacités sensori-motrices des rats traumatisés le premier jour après le traumatisme (J-1 *versus* J+1, $p < 0,001$). Une amélioration progressive apparaît lors des tests pratiqués par la suite (Fig. 4).

Comparativement, les rats témoins ne présentent aucune altération des performances dans le temps (TEMOIN (n=6) *versus* TRAUMA 1 (n=11), $p < 0,01$).

Le prétraitement avec le candésartan ne prévient pas l'altération des capacités sensori-motrices, et n'accélère pas leur récupération. De même, le post-traitement avec l'Ang IV ne favorise pas la récupération des capacités sensori-motrices (pas de différence significative entre les lots de rats traités et leurs contrôles respectifs TRAUMA 1 et 2, de J1 à J15).

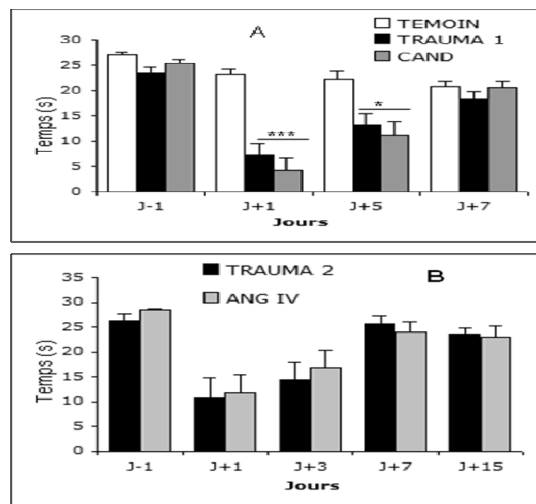


Figure 3. Test du scotch au niveau des pattes antérieures de rats. A: effet du prétraitement par le candésartan. B: effet du post traitement par l'angiotensine IV. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ESM des 2 meilleurs temps enregistrés sur les essais journaliers. Différence significative entre TEMOIN (n=6) *versus* TRAUMA 1 (n=11) et CAND (n=11) à J+1 *** $p < 0,001$ et à J+5 * $p < 0,05$.

Effet du traitement par l'Ang IV sur les performances cognitives avec le test de reconnaissance d'objet

Ce test permet d'apprécier la mémoire immédiate par le calcul de N/F, ratio du temps passé à explorer le nouvel objet (N) sur le temps passé à explorer l'objet familier (F). Les

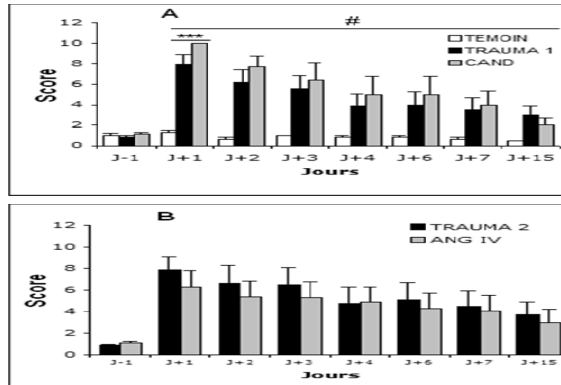


Figure 4. Test de marche sur la poutre. A: effet du prétraitement par le candésartan B: effet du post traitement par l'angiotensine IV. Un score total de 0 indique une grande facilité dans l'exécution de la tâche alors qu'un score de 10 signifie que l'animal est incapable d'accomplir la tâche. Différence significative entre j-1 versus j+1 pour les rats non traités (TRAUMA 1, n=11) ou traités avec le candésartan (CAND, n=11) *p<0,001; différence significative entre TMOIN (n=6) versus TRAUMA 1 (n=11) # p<0,01.**

résultats indiquent que le rapport N/F est diminué à J 15 chez les rats ayant subi le choc comparativement aux rats témoins (p<0,001) (Fig. 5). La comparaison entre le lot de rats traumatisés et le lot traité par l'angiotensine IV ne montre aucune différence significative.

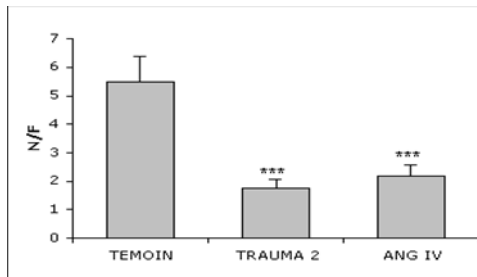


Figure 5. Test de reconnaissance d'objets à J15: N/F= ratio du temps passé à explorer le nouvel objet (N) sur le temps passé à explorer l'objet familier (F). Différence significative entre TMOIN (n=6) versus TRAUMA 2 (n=8) et ANG IV (n=10) *p<0,001; différence non significative entre les rats ANG IV (n=10) versus TRAUMA 2 (n=8).**

DISCUSSION

L'ensemble des résultats de cette étude ne confirme pas l'hypothèse d'un effet protecteur des sartans ou de l'angiotensine IV dans le modèle de traumatisme crânien utilisé. Ces résultats contrastent singulièrement avec l'ensemble concordant de données issues de laboratoires différents, dont le notre, qui montrent un effet protecteur clair des sartans en général, et en particulier de la molécule retenue dans ce travail, le candésartan, dans différents modèles d'ischémie cérébrale expérimentale chez le rat, la souris et la gerbille. De fait, ni le prétraitement des animaux par le candésartan ni le post traitement par l'angiotensine IV, de façon concordante et sans ambiguïté, n'ont d'effet positif ni sur les déficits évalués à J1, ni sur leur récupération spontanée progressive au cours de la première semaine, ni enfin sur les déficits consolidés à J15.

Le modèle de trauma crânien par impact-accélération de Marmarou (1994) est un modèle devenu classique de trauma crânien modéré, qui génère des lésions cérébrales modestes. Dans ce modèle, la sévérité du traumatisme dépend de l'accélération de l'ébranlement subi par le tissu cérébral, et est déterminé non seulement par l'accélération de l'impacteur (c'est-à-dire de sa masse et de sa hauteur de chute), mais aussi par l'épaisseur et la densité de la mousse sur laquelle repose l'animal et par l'angle d'impact (Li *et al.*, 2011), qui sont des paramètres beaucoup moins standardisés entre laboratoires. Dans ce modèle, la survenue d'un œdème cérébral n'est pas constante d'une équipe à l'autre (Gabrielian *et al.*, 2011; Verdonck *et al.*, 2007). Ainsi, bien que ce modèle ait permis à d'autres équipes d'objectiver un effet protecteur de certains traitements (Bouzat *et al.*, 2011; O'Connor *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2004), il est possible que dans les conditions expérimentales spécifiques dans lesquelles on a appliqué ce modèle, la sévérité des lésions obtenues soit trop modeste pour permettre de détecter avec une sensibilité suffisante l'effet protecteur d'un traitement. Les modèles de lésions ischémiques dans lesquels les effets protecteurs des angiotensines ont été mis en évidence s'accompagnent en effet de déficits sévères et d'une lourde mortalité, alors que dans notre étude, le score neurologique mesuré à J1 n'atteint qu'une valeur moyenne de 2 dans tous les groupes sur une échelle de 0 à 8.

Plusieurs arguments s'opposent en partie à cette interprétation. Même si les déficits, évalués de façon globale et grossière par le score neurologique sont modestes, les tests plus précis d'évaluation des déficits sensitifs (scotch-test) et sensorimoteurs (test de la poutre) permettent néanmoins d'affirmer que le traumatisme obtenu dans les conditions expérimentales de ce travail a bien été responsable de déficits. D'autre part, pour étudier séparément l'intérêt potentiel d'un prétraitement par le candésartan et d'un post-traitement par l'angiotensine IV, on a été conduit à inclure deux groupes contrôles recevant le placebo avant ou après le traumatisme. Ces deux groupes contrôles permettent d'affirmer que l'intensité des déficits, et la cinétique de leur diminution spontanée dans le temps sont très reproductibles. La taille des groupes expérimentaux est suffisante pour affirmer la significativité statistique de la régression spontanée des déficits. Ainsi, si les tests utilisés permettent de mesurer la régression dans le temps des déficits, même si ceux-ci sont modestes à l'origine, ils devraient permettre d'identifier un éventuel effet protecteur conféré par les traitements. Enfin, même si le score neurologique n'objective qu'une atteinte modeste, le test de reconnaissance d'objet met en évidence un déficit franc de la mémoire de travail, objectivant une atteinte cognitive consolidée à 15 jours sur laquelle l'angiotensine IV n'a aucun effet, alors même qu'en dehors de tout contexte traumatique ou ischémique, les propriétés pro cognitives de l'angiotensine IV sont bien établies (Wright & Harding, 2004; Wright *et al.*, 1993; Albiston *et al.*, 2003).

Il reste ainsi possible que les mécanismes de protection par les ARBs ne soient opérants que si les lésions sont sévères, et que le traitement par l'angiotensine IV ait été d'une durée trop courte pour apporter la protection cognitive anticipée.

Le contexte de la recherche en neuroprotection, tant dans le contexte de l'AVC que dans celui du TC, est qu'il met en lumière la contradiction entre de très nombreuses études précliniques positives avec de nombreuses molécules différentes, et l'échec cuisant systématique des études cliniques (Ginsberg, 2009; Xiong *et al.*, 2009). Les raisons de l'échec translationnel de la neuroprotection sont nombreuses et variées (STAIR, 1999), mais il semble clair que nombre d'essais cliniques ont vu le jour de façon prématurée, avant que l'analyse d'un nombre suffisant de travaux précliniques expérimentaux ait permis de déterminer les conditions optimales de l'efficacité des traitements. Cette analyse est d'autant plus difficile qu'un biais de publication tend à ne rendre disponible que les études positives, alors que les résultats négatifs, pourtant informatifs quant aux conditions nécessaires d'un éventuel succès ne sont pas accessibles.

Il est intéressant de noter que, si aucune étude en dehors du présent travail n'a évalué l'intérêt des sartans dans le TC, une étude australienne récente montre que dans le modèle de TC par impact-accélération un prétraitement par deux inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) différents entraîne une aggravation des déficits moteurs évalués à J7 par le Rotarod (Harford-Wright *et al.*, 2010). L'interprétation proposée par les auteurs pour rendre compte de l'effet délétère des IEC est l'inhibition de la dégradation de la substance P par l'enzyme de conversion. Toutefois, l'explication alternative que les angiotensines ont un effet protecteur au cours du TC, comme cela a été montré dans l'ischémie cérébrale, mérite d'être considérée. En dépit des résultats négatifs rapportés ici, le potentiel thérapeutique des sartans dans le TC devra être réévalué dans un modèle expérimental responsable de lésions plus sévères avant d'être définitivement écarté.

RÉFÉRENCES

- Achard, J.M., Fournier, A., Mazouz, H., Caride, V.J., Penar, P.L., Fernandez, L.A. 2001. Protection against ischemia: a physiological function of the renin-angiotensin system. *Biochem. Pharmacol.*, 62: 261-271.
- Albiston, A.L., Mustafa, T., McDowall, S.G., Mendelsohn, F.A., Lee, J., Chai, S.Y. 2003. AT4 receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: potential mechanisms of memory enhancement. *Trends Endocrinol. Metab.*, 14: 72-77.
- Beauchamp, K., Mutlak, H., Smith, W.R., Shohami, E., Stahel, P.F. 2008. Pharmacology of traumatic brain injury: where is the "golden bullet"? *Mol. Med.*, 14: 731-740.
- Bouzat, P., Francony, G., Thomas, S., Valable, S., Mauconduit, F., Fevre, M.C., Barbier, E.L., Bernaudin, M., Lahrech, H., Payen, J.F. 2011. Reduced brain oedema and functional deficits after treatment of diffuse traumatic brain injury by carbamylated erythropoietin derivative. *Crit. Care Med.*, 39:1-7.
- Dalmay, F., Mazouz, H., Allard, J., Pestil, F., Achard, J.M., Fournier, A. 2001. Non-AT(1)-receptor-mediated protective effect of angiotensin against acute ischaemic stroke in the gerbil. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, 2:103-106.
- Engelhorn, T., Goerike, S., Doerfler, A., Okorn, C., Forsting, M., Heusch, G., Schulz, R. 2004. The angiotensin II type 1-receptor blocker candesartan increases cerebral blood flow, reduces infarct size, and improves neurologic outcome after transient cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 24:467-474.

- Ennaceur, A., Delacour, J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behav. Brain Res.*, 31:47-59.
- Faure, S., Chapot, R., Tallet, D., Javellaud, J., Achard, J.M., Oudart, N. 2006. Cerebroprotective effect of angiotensin IV in experimental ischemic stroke in the rat mediated by AT(4) receptors. *J. Physiol. Pharmacol.*, 57:329-342.
- Faure, S., Bureau, A., Oudart, N., Javellaud, J., Fournier, A., Achard, J.M. 2008. Protective effect of candesartan in experimental ischemic stroke in the rat mediated by AT2 and AT4 receptors. *J. Hypertens.*, 26:2008-2015.
- Gabrielian, L., Willshire, L.W., Helps, S.C., van den Heuvel, C., Mathias, J., Vink, R. 2011. Intracranial pressure changes following traumatic brain injury in rats: lack of significant change in the absence of mass lesions or hypoxia. *J. Neurotrauma*, Epub ahead of print.
- Germano, A.F., Dixon, C.E., d'Avella, D., Hayes, R.L., Tomasello, F. 1994. Behavioral deficits following experimental subarachnoid hemorrhage in the rat. *J. Neurotrauma*, 11:345-353.
- Ginsberg, M.D. 2008. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*, 55:363-389.
- Ginsberg, M.D. 2009. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. *Stroke*, 40:S111-114.
- Groth, W., Blume, A., Gohlke, P., Unger, T., Culman, J. 2003. Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J. Hypertens.* 21:2175-2182.
- Harford-Wright, E., Thornton, E., Vink, R. 2010. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors exacerbate histological damage and motor deficits after experimental traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.*, 481:26-29.
- Iwai, M., Liu, H.W., Chen, R., Ide, A., Okamoto, S., Hata, R., Sakanaka, M., Shiuchi, T., Horiuchi, M. 2004. Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation*, 110:843-848.
- Iwanami, J., Mogi, M., Li, J.M., Tsukuda, K., Min, L.J., Sakata, A., Fujita, T., Iwai, M., Horiuchi, M. 2008. Deletion of angiotensin II type 2 receptor attenuates protective effects of bone marrow stromal cell treatment on ischemia-reperfusion brain injury in mice. *Stroke*, 39:2554-2559.
- Komotar, R.J., Kim, G.H., Sughrue, M.E., Otten, M.L., Rynkowski, M.A., Kellner, C.P., Hahn, D.K., Merkow, M.B., Garrett, M.C., Starke, R.M., Connolly, E.S. 2007. Neurologic assessment of somatosensory cerebral ischemia. *Nat. Protoc.*, 2:2345-2347.
- Korenova, M., Zilka, N., Stozicka, Z., Bugos, O., Vanicky, I., Novak, M. 2009. NeuroScale, the battery of behavioral tests with novel scoring system for phenotyping of transgenic rat model of tauopathy. *J. Neurosci. Methods*, 177:108-114.
- Li, J., Culman, J., Hortnagl, H., Zhao, Y., Gerova, N., Timm, M., Blume, A., Zimmermann, M., Seidel, K., Dirnagl, U., Unger, T. 2005. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia induced neuronal injury. *Faseb. J.*, 19:617-619.
- Li, Y., Zhang, L., Kallakuri, S., Zhou, R., Cavanaugh, J.M. 2011. Quantitative relationship between axonal injury and mechanical response in a rodent head impact acceleration model. *J. Neurotrauma*, 28:1767-1782.
- Lou, M., Blume, A., Zhao, Y., Gohlke, P., Deuschl, G., Herdegen, T., Culman, J. 2004. Sustained blockade of brain AT1 receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis, and inflammatory responses in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 24:536-547.

- Magy, L., Vincent, F., Faure, S., Messerli, F.H., Wang, J.G., Achard, J.M., Fournier, A. 2005. The renin-angiotensin systems: evolving pharmacological perspectives for cerebroprotection. *Curr. Pharm. Des.*, 11:3275-3291.
- Marmarou, A., Foda, M.A., van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H., Demetriadou, K. 1994. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: pathophysiology and biomechanics. *J. Neurosurg.*, 80:291-300.
- Miyamoto, N., Zhang, N., Tanaka, R., Liu, M., Hattori, N., Urabe, T. 2008. Neuroprotective role of angiotensin II type 2 receptor after transient focal ischemia in mice brain. *Neurosci. Res.*, 61:249-256.
- O'Connor, C.A., Cernak, I., Johnson, F., Vink, R. 2007. Effects of progesterone on neurologic and morphologic outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Exp. Neurol.*, 205:145-153.
- Oprisiu-Fournier, R., Faure, S., Mazouz, H., Boutitie, F., Serot, J.M., Achard, J.M., Godefroy, O., Hanon, O., Temmar, M., Albu, A., Strandgaard, S., Wang, J., Black, S.E., Fournier, A. 2009. Angiotensin AT1- receptor blockers and cerebrovascular protection: do they actually have a cutting edge over angiotensin-converting enzyme inhibitors? *Expert Rev. Neurother.*, 9:1289-1305.
- Schouten, J.W. 2007. Neuroprotection in traumatic brain injury: a complex struggle against the biology of nature. *Curr. Opin. Crit. Care*, 13:134-142.
- Stroke Therapy Academic Industry Round Table (STAIR) 1999. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*, 30:2752-2758.
- Tagliaferri, F., Compagnone, C., Korsic, M., Servadei, F., Kraus, J. 2006. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir. (Wien)*, 148:255-268; discussion 268.
- Turner, R.J., Dasilva, K.W., O'Connor, C., van den Heuvel, C., Vink, R. 2004. Magnesium gluconate offers no more protection than magnesium sulphate following diffuse traumatic brain injury in rats. *J. Am. Coll. Nutr.*, 23:541S-544S.
- Verdonck, O., Lahrech, H., Francony, G., Carle, O., Farion, R., Van de Looij, Y., Remy, C., Segebarth, C., Payen, J.F. 2007. Erythropoietin protects from post-traumatic edema in the rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 27:1369-1376.
- Werner, C., Engelhard, K. 2007. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br. J. Anaesth.*, 99:4-9.
- Wright, J.W., Harding, J.W. 2004. The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog. Neurobiol.*, 72:263-293.
- Wright, J.W., Miller-Wing, A.V., Shaffer, M.J., Higginson, C., Wright, D.E., Hanesworth, J.M., Harding, J.W. 1993. Angiotensin II(3-8) (ANG IV) hippocampal binding: potential role in the facilitation of memory. *Brain Res. Bull.*, 32:497-502.
- Xiong, Y., Mahmood, A., Chopp, M. 2009. Emerging treatments for traumatic brain injury. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, 14:67-84.