



HAL
open science

Étude de la toxicité vasculaire de l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA) après une ischémie cérébrale

Marie Garraud

► **To cite this version:**

Marie Garraud. Étude de la toxicité vasculaire de l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA) après une ischémie cérébrale. Pharmacologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05P618 . tel-01131164

HAL Id: tel-01131164

<https://theses.hal.science/tel-01131164>

Submitted on 18 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie et Imageries

Spécialité : Pharmacologie

Présentée par

Marie GARRAUD

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

**ETUDE DE LA TOXICITÉ VASCULAIRE
DE L'ACTIVATEUR TISSULAIRE DU PLASMINOGENÈ RECOMBINANT (rt-PA)
APRÈS UNE ISCHÉMIE CÉRÉBRALE**

Soutenue publiquement le 27 novembre 2014

Devant le jury composé de :

Pr Carine ALI

Rapporteur

Pr Vincent BEREZOWSKI

Rapporteur

Pr Christine MARIE

Examineur

Dr Xavier LOYER

Examineur

Dr Virginie BERAY-BERTHAT

Co-directrice de thèse

Pr Isabelle MARGAILL

Directrice de thèse

À ma mère et à mon père ...

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce travail, de près ou de loin. À celles qui m'ont donné l'envie de débiter ce doctorat, à celles qui m'ont accompagnée tout au long de ces trois années riches en découvertes et en épreuves, et surtout, à celles qui m'ont apporté leur soutien des plus fidèle.

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury pour avoir évalué mon travail de thèse :

À Madame le Professeur Carine Ali et Monsieur le Professeur Vincent Berezowski, qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse et qui ont pris le temps d'examiner mon travail avec attention.

À Madame le Professeur Christine Marie et Monsieur le Docteur Xavier Loyer, qui ont accepté de siéger dans ce jury en tant qu'examineur.

Je tiens également à remercier **Mesdames le Professeur Isabelle Margail et le Docteur Virginie Beray-Berthat**,

Pour m'avoir fait découvrir la recherche préclinique il y a six ans déjà... ,

Pour m'avoir fait confiance tout au long de ces trois années de doctorat,

Pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde de l'enseignement,

Pour leur soutien et leur présence au cours de cette aventure, dans les moments de joie mais également de doutes,

Je leur exprime ma profonde reconnaissance.

Je remercie **Madame le Professeur Catherine Marchand-Ieroux**,

Pour m'avoir acceptée dans son laboratoire et donné l'opportunité de découvrir le domaine passionnant de la Pharmacologie et des Neurosciences.

J'exprime mes sincères remerciements à **Madame le Docteur Chantal Boulanger**,

Pour m'avoir accueillie au sein de son équipe durant ces trois années,

Pour m'avoir fait découvrir le monde surprenant des microparticules,

Pour ses précieux conseils, sa disponibilité et son soutien.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont contribué à mes travaux de thèse :

Au Docteur Mohamad El Amki, le Monsieur Thrombine chez qui tout réussi. Je te remercie de m'avoir appris le modèle. Merci pour tes nombreux conseils et surtout ta patience. Le mystère des reperfusion spontanées reste intact...

Au Docteur Anne-Clémence Vion, Madame Microparticule ! J'ai beaucoup appris en travaillant avec toi. Ta persévérance et ton optimisme te caractérisent. Merci pour tout ce temps passé face au Gallios !

Je remercie également toute **l'équipe du PARCC** qui s'est toujours rendue disponible pour m'aider, avec en particulier **Min, Jean-Marie, Cécile et Isabelle**.

Aux Docteurs Sandra Manceau et Claire Leconte, merci pour vos conseils et votre disponibilité. Grâce à vous, j'ai pu découvrir les joies de la culture cellulaire, et les bEnd.3 sont devenues mes meilleures amies, voire parfois ennemies!

À Monsieur le Docteur Bernard Le Bonniec, pour tout le temps passé autour des dosages de thrombine, et ses précieux conseils concernant la détection de la fibrine.

À Zoé Hanss, Federica Pallante, Florian Rebeillard, Charlotte Abbou, vous avez contribué à ce travail et je vous en remercie. Vous avez supporté mes bonnes et mauvaises humeurs et je vous en félicite ! J'espère que ce travail vous a ouvert l'appétit sur le monde de la recherche, et peut être serez vous bientôt à ma place ...

Enfin, je remercie toutes les personnes qui m'ont accompagnée au cours de mon doctorat :

A tous les membres de l'EA4475,

A Monsieur le Professeur Michel Plotkine, pour vos discussions toujours des plus enrichissantes,

A Mesdames les Docteurs Valérie Besson, Dominique Lerouet, à Monsieur le Docteur Raymond Mongeau, et à Bérard Coqueran, pour votre aide et vos encouragements à mon égard.

A toute l'équipe de Physiologie, merci pour votre accueil. Vous m'avez accompagnée lors de mes premiers pas dans le monde de l'enseignement et je vous en remercie.

Au trio Bruno Palmier - Nicole Croci - Françoise Merlier, je vous remercie sincèrement pour votre soutien, votre bonne humeur et votre gentillesse. Qu'il a été agréable de franchir la porte de votre bureau multifonction : bureau des rires, des plaintes et du chocolat ! Je tiens en particulier à remercier le Docteur Bruno Palmier, pour ton incroyable optimisme et pour ton aide scientifique.

A tous les anciens du labo, cette aventure n'aurait jamais été la même sans avoir croisé vos chemins.

Aux ex-doctorants : **Eleni, Magalie, Tiphaine, Haymen, Cindy Fabian**, merci pour votre soutien et vos petits grain de folie,

A ceux qui ont fait un passage remarqué au labo : **Marine** (ma collègue allemande !), **Camille Léonetti** (merci pour ton soutien énorme !!), **Gemmmma** (Marrrrrie Garrrrraud), **Camille (KaKa), Alice**,

A mes collègues de bureau, **Fei** et **Marie**, qui ont supporté mes humeurs, merci pour tous ces moments de partage. Marie, ma complice, tu as toujours été là, merci pour ton soutien et ton amitié sans faille. Je peux maintenant te l'avouer, tu as toujours été la marie n°1 !

A **Angelo**, bon courage pour la suite de ton aventure,

A **Mehrnaz**, pour ta bonne humeur et ta gentillesse,

Aux futurs Docteurs du laboratoire, Toufik et Kahina.

Je tiens également à remercier **mes amis** de longue date : **Athé** et **Camille**, merci pour votre immense soutien depuis près de 15 ans ; **Nico** (Hijo) et **Solenn**, mes complices de lycée, appelez moi Docteur Pappus maintenant!!! ; **Claire**, merci pour toutes ces années de pharma à tes côtés, Merci pour votre amitié fidèle et votre patience depuis toutes ces années. Après pharma et la thèse, j'arrête, fini les études !

Je remercie sincèrement **ma famille** et en particulier **mes grands-mères**. Votre soutien et votre écoute m'ont été d'une grande aide au cours de ces longues années d'études et de doctorat. Je pense également à ceux qui ne sont plus là...

Enfin, cette thèse n'aurait pas eu lieu sans le soutien, l'écoute et les encouragements de **mes parents, d'Aurélie et de Sébastien**. Vous êtes mes repères, et bien plus encore...

Et enfin, merci à **toi**, merci d'être là...

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	3
PRÉAMBULE: LES ACCIDENTS VASCULAIRES CÉRÉBRAUX EN QUELQUES MOTS	3
Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) : de l'étiologie à la clinique	3
→ Définitions et épidémiologie	3
→ Classification des AVC.....	4
→ Manifestations cliniques et prise en charge des AVCi	5
Physiopathologie des AVCi	6
→ Évolution spatio-temporelle de la lésion	6
→ Principaux mécanismes délétères au cours de l'ischémie cérébrale.....	7
PREMIER CHAPITRE :	11
LES ATTEINTES MICROVASCULAIRES AU COURS DE L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE	11
I. Thrombose post-ischémique : dépôts de fibrine	12
1. Mécanismes de formation de la fibrine	12
2. Dépôts de fibrine dans les microvaisseaux après une ischémie cérébrale	14
a) Études précliniques	14
b) Études cliniques	15
II. Inflammation et vaisseaux : ICAM-1 et VCAM-1.....	16
1. ICAM-1 et VCAM-1 : structure et ligands.....	16
a) ICAM-1.....	16
b) VCAM-1	17
2. ICAM-1 / VCAM-1 et ischémie cérébrale	17
a) Etudes précliniques	17
b) Etudes cliniques	18
III. Des liens entre inflammation et thrombose.....	19
IV. Hypoperfusion et phénomène de « no reflow ».....	20
DEUXIÈME CHAPITRE : LES MICROPARTICULES	23
Introduction.....	23
I. Mécanismes de formation des microparticules	24
1. Vésiculation.....	24
2. Mécanismes moléculaires.....	25
II. Caractéristiques des microparticules.....	28
1. Structure des microparticules.....	28
2. Critères de distinction entre microparticules et autres vésicules membranaires	29
III. Méthodes d'analyse des microparticules.....	31
1. Recommandations pré-analytiques	31
2. Cytométrie en flux	31
3. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) et test de capture en phase solide	32
4. Microscopie électronique à transmission / à force atomique	32
5. Tests fonctionnels	32
IV. Microparticules endothéliales (MPE) : marqueurs et acteurs	33
1. MPE et vasoréactivité	35
2. MPs et inflammation	36
3. MPE et hémostase	36
4. MPE et angiogenèse	38
V. Clairance des microparticules	39

VI.	Microparticules et AVC	40
1.	Microparticules au sein du système nerveux central (SNC).....	40
2.	Microparticules et AVC : les études cliniques	42
TROISIÈME CHAPITRE : LA THROMBOLYSE PAR LE RT-PA LORS D'UN AVCi		46
I.	Structure et mécanisme d'action du t-PA	46
II.	Le rt-PA en clinique	48
III.	Le rt-PA, un thrombolytique pas toujours efficace !	49
1.	Recanalisation sous rt-PA.....	49
a)	Données cliniques	49
b)	Mécanismes	50
2.	Hypoperfusion / réocclusion sous rt-PA	52
a)	Données cliniques	52
b)	Mécanismes.....	53
3.	Conclusion.....	56
IV.	rt-PA, l'envers du décor : risque hémorragique et toxicité neuronale	57
1.	Transformations hémorragiques	57
a)	Transformations hémorragiques spontanées à la suite d'un AVC	57
b)	Transformations hémorragiques induites par le rt-PA.....	58
2.	Toxicité neuronale	59
V.	Conclusion et alternatives.....	60
QUATRIÈME CHAPITRE : LA POLY (ADP-RIBOSE) POLYMÉRISE OU PARP		62
I.	La PARP-1 : structure et fonctionnement.....	62
1.	Structure de la PARP-1	62
2.	Fonctionnement de la PARP-1 : la poly(ADP-ribosyl)ation	63
a)	Synthèse des PARs.....	63
b)	Dégradation des PARs	65
II.	Rôles bénéfiques de la PARP en conditions physiologiques	66
1.	Réparation de l'ADN et stabilité du génome	66
2.	Régulation de la transcription génique.....	67
3.	Autres fonctions physiologiques de la PARP.....	67
III.	Rôle délétère de la PARP au cours de l'ischémie cérébrale	68
1.	Activation post-ischémique de la PARP	68
2.	Mise en évidence du rôle délétère de la PARP après l'ischémie cérébrale	69
3.	Mécanismes à l'origine du rôle délétère de la PARP après une ischémie cérébrale	71
a)	PARP et mort cellulaire.....	71
b)	PARP et inflammation	72
IV.	PARP, atteintes microvasculaires et dysfonction endothéliale	73
1.	Au cours de l'ischémie cérébrale et de la thrombolyse.....	73
2.	Autres maladies cardiovasculaires.....	74
3.	PARP, plaquettes et perfusion tissulaire.....	77
BUT DU TRAVAIL		79
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		81
PREMIÈRE PARTIE : EXPÉRIMENTATIONS <i>IN VIVO</i>		81
I.	Modèle d'ischémie cérébrale focale par injection de thrombine	81
1.	Détermination de l'activité de la thrombine	81
2.	Préparation des micropipettes	82
3.	Réalisation de l'ischémie cérébrale chez la souris	82
II.	Protocole d'administration des agents pharmacologiques	84
III.	Exsanguinoperfusion des animaux	86

IV.	Évaluation des volumes de lésion cérébrale.....	86
1.	Coloration de la lésion par le TTC	86
2.	Coloration de la lésion par le violet de crésyl	87
3.	Quantification du volume de lésion cérébrale.....	88
V.	Évaluation de la présence de fibrine et de l'expression des molécules d'adhésion	88
1.	Western blot	88
a)	Prélèvement et préparation des échantillons	88
b)	Dosage des protéines	90
c)	Réalisation du Western blot	91
d)	Remarques	94
2.	Immunohistochimie (IHC)	94
a)	Réalisation de l'IHC.....	94
b)	Quantification des immunomarquages.....	97
VI.	Détection des microparticules.....	98
1.	Prélèvement des échantillons.....	98
a)	Prélèvement de sang et préparation du plasma	98
b)	Prélèvement du tissu cérébral et broyage	99
2.	Dosage des microparticules	99
a)	Principe du dosage des MPs par cytométrie en flux	99
b)	Marquage CD144 (VE-cadhérine).....	100
c)	Marquage CD31 (PECAM-1) et CD41 (GPIIb)	101
d)	Marquage de la phosphatidylsérine par l'Annexine V	101
DEUXIÈME PARTIE : EXPÉRIMENTATIONS <i>IN VITRO</i>		102
I.	Culture de cellules endothéliales cérébrales.....	102
1.	Protocole de culture cellulaire	102
2.	Traitements des cellules	102
II.	Étude de la morphologie cellulaire	103
III.	Évaluation de la survie des cellules	103
IV.	Évaluation de l'expression des protéines de jonctions et d'adhésion par Western blot.....	104
1.	Préparation des échantillons et dosage des protéines	104
2.	Réalisation des Western blot	104
V.	Dosage des microparticules endothéliales (MPE).....	105
1.	Isolation des MPE.....	105
2.	Marquage des MPE par l'annexine V et dosage par cytométrie en flux	106
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		109
PREMIÈRE PARTIE		109
Études <i>in vivo</i> des effets vasculaires du rt-PA au cours de l'ischémie cérébrale		109
I.	Prise en main du modèle d'ischémie cérébrale par injection de thrombine chez la souris	109
1.	Prise en main du modèle	109
a)	Résultats.....	110
b)	Discussion.....	111
2.	Modifications du protocole.....	114
a)	Augmentation de la concentration de la solution de thrombine	114
b)	Évolution du modèle dans le temps.....	116
II.	Rôle du rt-PA dans les phénomènes d'hypoperfusion et de réocclusion : étude des dépôts de fibrine	117
1.	Localisation du caillot 30 minutes après l'injection de thrombine	117
2.	Étude des dépôts de fibrine 24 heures après l'ischémie cérébrale : effet du rt-PA	120
a)	Mise au point du Western blot de fibrine	120

b)	Effet de l'ischémie et du rt-PA sur les dépôts de fibrine à 24 heures	124
c)	Étude du rôle de la PARP dans la présence des dépôts de fibrine 24 heures après l'ischémie et après traitement par le rt-PA	126
d)	Discussion.....	128
III.	Évaluation des atteintes endothéliales induites par le rt-PA après une ischémie cérébrale	130
1.	Étude de l'expression de VCAM-1.....	130
a)	Effet de l'ischémie et du rt-PA sur l'expression de VCAM-1 évaluée par Western blot.....	130
b)	Effet de l'ischémie et du rt-PA sur l'expression de VCAM-1 évaluée par IHC : étude du rôle de la PARP	132
c)	Discussion	136
2.	Étude de l'expression d'ICAM-1.....	139
a)	Effet de l'ischémie et du rt-PA sur l'expression d'ICAM-1 évaluée par Western blot.....	139
b)	Effet de l'ischémie et du rt-PA sur l'expression d'ICAM-1 évaluée par IHC	142
c)	Discussion	145
3.	Détection des microparticules (MPs).....	147
a)	Recherche des MPs circulantes	147
b)	Recherche des MPs présentes dans le parenchyme cérébral	149
c)	Discussion : La détection des microparticules <i>in vivo</i>	149
	DEUXIÈME PARTIE	151
	Études <i>in vitro</i> des effets du rt-PA sur les cellules endothéliales.....	151
I.	Effet du rt-PA sur la morphologie et l'organisation des cellules bEnd.3	152
II.	Effet du rt-PA sur les jonctions inter-endothéliales	153
1.	Protocole expérimental	153
2.	Résultats	154
3.	Discussion	155
III.	rt-PA et activation des cellules bEnd.3 : recherche d'un effet pro-inflammatoire.....	156
1.	Protocole expérimental	156
2.	Résultats	157
3.	Discussion	158
IV.	rt-PA et activation des cellules bEnd.3 : recherche d'une libération de MPE.....	159
1.	Expériences préliminaires	159
a)	Stimulation des cellules endothéliales par le TNF et la thrombine pendant 24 heures	159
b)	Effet du rt-PA sur la libération des MPE après 6 heures de traitement	161
2.	Effet du rt-PA sur les cellules bEnd.3 à des temps tardifs.....	164
a)	Présentation des objectifs	164
b)	Article	165
c)	Expérience complémentaire : effets du INO-1001, un second inhibiteur de PARP	181
d)	Résumé des principaux résultats et discussion complémentaire	183
V.	Effet du rt-PA sur les cellules bEnd.3 en présence de glutamate.....	188
1.	Etude préliminaire : effet propre du glutamate sur la libération des MPE.....	188
2.	Effet du rt-PA sur les cellules endothéliales cérébrales en présence de glutamate	190
a)	Protocole expérimental.....	190
b)	Résultats.....	190
c)	Discussion	192
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	195
	ANNEXE.....	201
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	203

RÉSUMÉ

Le seul traitement actuellement disponible pour les accidents vasculaires cérébraux d'origine ischémique est la thrombolyse par l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA). Cependant, l'efficacité du rt-PA est souvent partielle ou absente, et des phénomènes de réocclusion du vaisseau peuvent être observés. Par ailleurs, l'administration de rt-PA est associée à un risque hémorragique. Il apparaît donc indispensable de rechercher les mécanismes à l'origine de la toxicité vasculaire du rt-PA, afin de pouvoir développer des stratégies capables de protéger le lit vasculaire. Parmi ces stratégies, notre équipe a montré dans des modèles expérimentaux que l'inhibition d'une enzyme nucléaire, la poly(ADP-ribose) polymérase ou PARP, permet de protéger la barrière hémato-encéphalique, de réduire les hémorragies et d'améliorer la reperfusion cérébrale suite à l'administration post-ischémique de rt-PA.

Dans ce contexte, mon travail a consisté à étudier les mécanismes impliqués dans les altérations vasculaires associées à l'administration de rt-PA à la suite de l'ischémie. Mes travaux de recherche ont comporté un volet *in vivo* et un volet *in vitro*.

Les études réalisées *in vivo* ont été menées dans un modèle murin d'ischémie cérébrale thromboembolique. Nos résultats indiquent que ni l'ischémie, ni le rt-PA, ni l'association au rt-PA d'un puissant inhibiteur de PARP, le PJ34, ne modifient à 24 heures la présence de dépôts de fibrine, marqueur d'hypoperfusion et de réocclusion. Nous nous sommes ensuite intéressés à deux marqueurs endothéliaux d'inflammation : VCAM-1 et ICAM-1, et avons montré que leur expression, qui augmente 24 heures après l'ischémie, n'est pas modifiée par le rt-PA. Enfin, l'association du PJ34 au rt-PA réduit significativement l'expression post-ischémique de VCAM-1, ce qui suggère le rôle de la PARP dans l'expression de cette molécule d'adhésion.

La seconde partie de mon travail a été réalisée *in vitro* sur une lignée de cellules endothéliales cérébrales murines (bEnd.3). Le rt-PA est à l'origine de changements caractéristiques au niveau de l'organisation et de la morphologie de ces cellules. Ces changements ne sont pourtant associés ni à une dégradation de l'expression des molécules de jonctions inter-endothéliales (occludine, VE-cadhérine), ni à une augmentation de l'expression des marqueurs endothéliaux pro-inflammatoires (VCAM-1, ICAM-1). Nous nous sommes également intéressés à d'autres marqueurs de dysfonction endothéliale, les microparticules endothéliales (MPE). Nos résultats montrent que le rt-PA est à l'origine d'une augmentation importante de la libération des MPE. L'utilisation d'un inhibiteur de la protéine p38, le SB203580, et d'un inhibiteur de PARP, le PJ34, permet de réduire cette augmentation, ce qui suggère que p38 et la PARP pourraient être impliquées dans la production de MPE induite par le rt-PA.

En conclusion, l'ensemble de ce travail contribue à préciser les effets vasculaires du rt-PA. Parmi ces effets, la mise en évidence de la production de MPE, *via* la PARP, est particulièrement novatrice.

DISCIPLINE

Neuropharmacologie

MOTS CLÉS

- Accidents vasculaires cérébraux
- Activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA)
- bEnd.3
- Endothélium
- Fibrine
- Ischémie cérébrale
- Microparticules endothéliales
- Molécules d'adhésion
- PJ34
- Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP)

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1: « Time is brain » (d'après Saver, 2006).....	5
Figure 2 : Evolution spatiale et temporelle des lésions post-ischémiques (d'après Kunz et al., 2010).....	7
Figure 3: Physiopathologie de l'ischémie cérébrale.....	8
Figure 4 : Mécanismes inflammatoires post-ischémiques (adaptée de Q. Wang et al., 2007).....	10
Figure 5: Schéma des étapes principales de la coagulation.....	12
Figure 6: Structure du fibrinogène (modifiée d'après Jennewein et al., 2011)	13
Figure 7 : Formation de la fibrine à partir du fibrinogène	13
Figure 8 : Relation croisée entre les mécanismes pro-thrombotiques et pro-inflammatoires	20
Figure 9 : Mécanismes de formation des MPs (adaptée d'après Hugel et al., 2005).....	25
Figure 10 : Mécanismes de formation des MPs après activation cellulaire et apoptose (d'après VanWijk et al., 2003).....	26
Figure 11 : Structure d'une MPE (adaptée d'après Dignat-George et Boulanger, 2011).....	29
Figure 12: Mécanismes empruntés par les MPs pour le transfert intercellulaire d'informations (d'après Mause et Weber, 2010)	34
Figure 13 : Les effets bénéfiques des MPs sur les neurones (d'après Schindler et al., 2014)	41
Figure 14 : Structure du t-PA (d'après Acheampong et Ford, 2012).....	47
Figure 15 : Étapes de la fibrinolyse initiée par le t-PA.....	47
Figure 16 : Ischémie cérébrale et thrombolyse en clinique (adaptée d'après Kaur et al., 2004)	57
Figure 17 : Représentation de la structure de la PARP-1 (modifiée d'après Fatokun et al., 2014)	62
Figure 18 : Structure d'une molécule de NAD ⁺ et site de clivage par la PARP (d'après Curtin et Szabo, 2013)	64
Figure 19 : La poly(ADP-ribosylation) : synthèse et dégradation des PARs, régénération du NAD ⁺ (modifiée d'après Heeres et Hergenrother, 2007).....	64
Figure 20 : Rôle de la PARP-1 dans la réparation de l'ADN (modifiée d'après Kraus, 2008).....	67
Figure 21 : Structures des principaux inhibiteurs de PARP (d'après Curtin et Szabo, 2013)	70
Figure 22 : Modèle d'ischémie cérébrale par injection de thrombine.....	83
Figure 23 : Suivi du DSC après l'injection de thrombine dans la lumière de l'ACM (n=8).....	84
Figure 24 : Protocole d'administration des agents pharmacologiques.....	85
Figure 25 : Coloration de la lésion cérébrale par le TTC 24 heures après l'ischémie.....	87
Figure 26 : Coloration de la lésion cérébrale par le violet de crésyl 24 heures après l'ischémie.....	87
Figure 27 : Prélèvement des échantillons pour l'étude des dépôts de fibrine par Western blot.....	89
Figure 28 : Prélèvement des échantillons pour l'étude de VCAM-1 et ICAM-1 par Western blot	90
Figure 29 : Quantification des immunomarquages	97
Figure 30 : Détection des microparticules par cytométrie en flux	100
Figure 31 : Détection des MPE issues des cellules bEnd.3 par cytométrie en flux après un marquage à l'AnnV	106
Figure 32 : Volumes de lésion évalués 24 heures après l'ischémie	115

Figure 33 : Répartition de la surface de lésion en fonction des niveaux de coupe 24 heures après l'ischémie (série 6)	116
Figure 34 : Localisation de la zone d'injection de la thrombine	118
Figure 35 : Localisation de la zone d'injection de la thrombine d'après l'atlas de Paxinos et Franklin (1997) ...	118
Figure 36 : Localisation du caillot de fibrine dans l'artère cérébrale moyenne après 30 minutes d'ischémie	119
Figure 37 : Membrane représentative des premiers essais de Western blot de fibrine	121
Figure 38 : Détection de la fibrine par Western blot 30 minutes après l'ischémie, au niveau de la zone d'injection de thrombine (région b) et en périphérie (région c).....	123
Figure 39 : Détection de la chaîne β de la fibrine sous la forme d'un doublet	123
Figure 40 : Effet de l'ischémie et du rt-PA sur les dépôts de fibrine évalués à 24 heures par Western blot	125
Figure 41 : Effet du rt-PA et du PJ34 sur la présence de dépôts de fibrine évaluée par Western blot 24 heures après une ischémie cérébrale.....	127
Figure 42 : Effet de l'ischémie et du rt-PA (0,9 mg/kg) sur l'expression de VCAM-1 évaluée à 6 heures et 24 heures par Western blot	131
Figure 43 : Photos représentatives de l'expression de VCAM-1 dans le cortex ipsilatéral à 24 heures.....	132
Figure 44 : Évaluation de l'expression de VCAM-1 par HIC, 24 heures après l'ischémie.....	133
Figure 45 : Effet du rt-PA et rôle de la PARP dans l'expression de VCAM-1 24 heures après l'ischémie.....	135
Figure 46 : Mise au point du Western blot d'ICAM-1 (AC anti-ICAM-1 n°1)	139
Figure 47 : Mise au point du Western blot d'ICAM-1 (AC anti-ICAM-1 n°2)	140
Figure 48 : Effet de l'administration de rt-PA sur l'expression d'ICAM-1 évaluée 6 heures et 24 heures après l'ischémie par Western blot (AC anti-ICAM-1 n°3)	141
Figure 49 : Mise au point du marquage d'ICAM-1 par immunofluorescence	142
Figure 50 : Photos représentatives de l'expression d'ICAM-1 à 24 heures au niveau du cortex ipsilatéral	143
Figure 51 : Évaluation de l'expression d'ICAM-1 par IHC à 24 heures : effet de l'ischémie et du traitement par le rt-PA.....	144
Figure 52 : Photos représentatives de l'effet du rt-PA sur la morphologie des cellules bEnd.3 après 6 heures d'incubation	153
Figure 53 : Effet du rt-PA sur l'expression de l'occludine par les cellules bEnd.3 évaluée par Western blot après 6 heures et 24 heures de traitement	154
Figure 54 : Effet du rt-PA sur l'expression de la VE-cadhérine par les cellules bEnd.3 évaluée par Western blot après 6 heures et 24 heures de traitement	155
Figure 55 : Effet du rt-PA sur l'expression d'ICAM-1 par les cellules bEnd.3 évaluée par Western blot après 6 heures et 24 heures de traitement	157
Figure 56 : Effet du rt-PA sur l'expression de VCAM-1 par les cellules bEnd.3 évaluée par Western blot après 6 heures de traitement.....	158
Figure 57 : Photos représentatives de l'effet du TNF et de la thrombine sur la morphologie des cellules bEnd.3 après 24 heures d'incubation	160

Figure 58 : Effet du TNF et de la thrombine sur la libération des MPE par les cellules bEnd.3 après 24 heures d'incubation	160
Figure 59 : Effet de l'EDTA sur le marquage des contrôles négatifs	162
Figure 60 : Effet du rt-PA sur la libération des MPE par les cellules bEnd.3 après 6 heures d'incubation	163
Figure 61 : Effet du INO-1001 sur la libération de MPE induite par le rt-PA après 24 heures de traitement.....	181
Figure 62 : Photos représentatives de l'effet du INO-1001, du rt-PA et de leur association sur la morphologie des cellules bEnd.3 après 24 heures d'incubation	182
Figure 63 : Effet du INO-1001, du rt-PA et de leur association sur la viabilité des cellules bEnd.3 après 24 heures d'incubation	183
Figure 64 : Effet glutamate sur la libération des MPE par les cellules bEnd.3 après 24 heures d'incubation	189
Figure 65 : Effet du rt-PA, du glutamate et de leur association sur la viabilité cellulaire après 15 heures et 24 heures d'incubation	191
Figure 66 : Photos représentatives de l'effet du rt-PA, du glutamate et de leur association sur la morphologie des cellules bEnd.3 après 15 heures et 24 heures d'incubation	191
Figure 67 : Effet du rt-PA, du glutamate et de leur association sur la libération des MPE après 15 heures et 24 heures d'incubation	192
Tableau 1 : Caractéristiques des vésicules extra-cellulaires (adapté de Balducci et al., 2012 et de Mause et Weber, 2010)	30
Tableau 2 : Caractéristiques des méthodes de détection des MPs (issu de la thèse du Dr Vion, 2012).....	33
Tableau 3 : Microparticules et AVC.....	42
Tableau 4 : Recanalisation après thrombolyse	50
Tableau 5 : Conditions expérimentales utilisées au cours des Western blot	93
Tableau 6 : Conditions expérimentales utilisées lors des immunohistochimies.....	95
Tableau 7 : Conditions expérimentales utilisées lors des immunofluorescences.....	96
Tableau 8 : Liste des agents pharmacologiques	103
Tableau 9 : Conditions expérimentales utilisées au cours des Western blot	105
Tableau 10 : Principaux paramètres évalués au cours de l'apprentissage du modèle d'ischémie cérébrale (thrombine à 0,75 UI/ μ L)	111
Tableau 11 : Taux de RS observés dans le modèle par injection de thrombine	112
Tableau 12 : Principaux paramètres évalués à la suite des modifications du protocole d'ischémie cérébrale (thrombine à 1 et 1,9 U/ μ L)	114
Annexe : Contre-indications à la thrombolyse intraveineuse par le rt-PA (Actilyse®) lors de l'ischémie cérébrale, selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) publiées en mai 2009 (www.has-sante.fr)....	201

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-AB	3-aminobenzamide
5-AIQ	5-aminoisoquinolinone
AC	Anticorps
ACM	Artère cérébrale moyenne
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
AIT	Accident ischémique transitoire
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMPA	Acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
Ang II	Angiotensine de type II
AnnV	Annexine V
ANOVA	Analyse de variance
ApoE	Apolipoprotéine E
ARN (m)	Acide ribonucléique (messenger)
A-SMase	Acide shingomyélinase
ATP	Adénosine triphosphate
AT₁R	Récepteurs de l'angiotensine de type II
AVC(i)	Accident vasculaire cérébral (ischémique)
BCA	Acide bicinchoninique
bEnd.3	Lignée de cellules endothéliales cérébrale murines (<i>brain endothelioma cell line</i>)
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BRCT	<i>Breast cancer type-1 C-terminus</i>
BSA	Albumine sérique bovine
CI50	Concentration inhibant 50% de l'activité enzymatique
COX	Cyclo-oxygénase
CRP	Protéine C réactive
DEL	<i>Developmental endothelial locus</i>
DHIQ	1,5-dihydroxyisoquinoline
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DO	Densité optique
DSC	Débit sanguin cérébral
DTNT	<i>Door to needle time</i>
ECASS	<i>European cooperative acute stroke study</i>
ECF	<i>Enhanced chemi fluorescence</i>
ECL	<i>Enhanced chemi luminescence</i>
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E-sélectine	Sélectine endothéliale
ESM	Écart standard à la moyenne
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fg	Fibrinogène
Fn	Fibrine
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FpA	Fibrinopeptide A
FpB	Fibrinopeptide B
FS	<i>forward scatter</i>
FT	Facteur tissulaire
GP	Glycoprotéine
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène

HAS	Haute autorité de santé
HIF-1	<i>hypoxia inducible factor 1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxydase</i>
i.a.	Intra-artérielle
IC	Ischémie cérébrale
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IL	Interleukine
Ig	Immunoglobuline
i.p.	Intrapéritonéale
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
i.v.	Intraveineuse
kDa	Kilodalton
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LFA-1	<i>Leukocyte function associated molecule-1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein</i>
L-sélectine	Sélectine leucocytaire
Mac-1	<i>Macrophage antigen-1</i>
MAPK	<i>Mitogen associated protein kinase</i>
MARH	Mono(ADP-ribose)hydrolase
MEC	Matrice extra-cellulaire
MERCI	<i>Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia</i>
MMP	Métalloprotéase de la matrice
MPE	Microparticules endothéliales
MPO	Myéloperoxidase
MPs	Microparticules
MTE	Micro-thrombo-embolies
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide
NaCl	Chlorure de sodium
NAD⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransférase
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NIHSS	<i>National Institutes of Health Stroke Score</i>
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NMNAT	Nicotinamide mononucléoside adényltransférase
NO	Monoxyde d'azote
NOS (n/e/i)	NO synthase (neuronale/endothéliale/inductible)
O₂^{•-}	Anion superoxyde
OH[•]	Radical hydroxyl
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONOO^{•-}	Anion peroxydinitrite
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAR	<i>Proteinase activated receptor</i>
PARs	Poly(ADP-riboses)
PARG	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
PBM	<i>PARs binding motif</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PEG	Poly-éthylène-glycol
PFP	<i>Platelet free plasma</i>
PMSF	Phénylméthylsulfonyl fluoride
PG	Prostaglandine
PGI₂	Prostaglandine I ₂

PJ34	N-(6-oxo-5,6-dihydro-phénanthridin-2-yl)-N,N-diméthylacétamide
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
PPP	<i>Poor platelet plasma</i>
P-sélectine	Sélectine plaquettaire
PSGL-1	<i>P-sélectine glycoprotein ligand 1</i>
PSR	Récepteur de la phosphatidylsérine
PVDF	Polyvinylidène difluoride
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RS	Reperfusion spontanée
rt-PA	Activateur tissulaire du plasminogène recombinant
sctPA	<i>Single chain t-PA</i>
SD	Déviation standard
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SNC	Système nerveux central
SS	<i>Side scatter</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
TBS	<i>Tris buffer saline</i>
tctPA	<i>Two chain t-PA</i>
TEMED	Tétraméthyl-éthylène-diamine
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TH	Transformations hémorragiques
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TO	Souris témoins-opérées
TOAST	<i>Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i>
t-PA	Activateur tissulaire du plasminogène
TPBS	Tampon phosphate pH 7,4 contenant du tween 20®
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TTBS	Tampon salin Tris/HCl pH 7,4 contenant du tween 20®
TTC	Chlorure de triphényltétrazolium
UA	Unités arbitraires
uPA	<i>Urokinase type plasminogen activator</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VE-cadhérine	<i>Vascular endothelial cadhérine</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i> ou $\alpha 4\beta$

INTRODUCTION

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) touchent chaque année près de 16 millions de personnes dans le monde. L'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'en 2012, les AVC représentaient la 2^{ème} cause de mortalité après les cardiopathies ischémiques. Par ailleurs, parmi les patients qui survivent à cette maladie, la majorité d'entre eux présente des séquelles invalidantes. Face à cette maladie fréquente dont les conséquences peuvent être irréversibles, les cliniciens ne disposent à l'heure actuelle d'aucun traitement neuroprotecteur. Le seul traitement approuvé pour la prise en charge des AVC d'origine ischémique (80% des AVC) est l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA, alteplase, Actilyse®). Il s'agit d'un thrombolytique dont l'utilisation doit permettre la recanalisation du vaisseau occlus et donc la reperfusion des tissus ischémiés. Malheureusement, son emploi s'avère extrêmement restreint en raison notamment de ses nombreuses contre-indications et de sa fenêtre thérapeutique étroite. Hormis le risque de transformations hémorragiques (TH), qui représente son principal effet indésirable, le rt-PA ne présente malheureusement qu'une efficacité partielle pour la majorité des patients (recanalisation du vaisseau inexistante ou partielle). Enfin, quelle que soit l'efficacité du rt-PA, des phénomènes de réocclusion peuvent survenir chez les patients.

L'identification des effecteurs intervenant dans la toxicité vasculaire du rt-PA semble donc essentielle et permettrait d'une part de diminuer le risque hémorragique, et d'autre part, d'améliorer son efficacité. Parmi ces effecteurs, notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à une enzyme nucléaire, la poly(ADP-ribose)polymérase ou PARP ; notre équipe a montré expérimentalement que la PARP contribue aux TH induites par le rt-PA et entrave la reperfusion post-thrombolyse.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a été consacré à l'étude de la toxicité vasculaire du rt-PA, et plus particulièrement à sa toxicité endothéliale, ainsi qu'aux mécanismes à l'origine de cette toxicité et à leur relation avec la PARP. Parmi les différents évènements susceptibles de contribuer à la dysfonction endothéliale induite par le rt-PA, je me suis intéressée aux phénomènes de réocclusion (évalués par la présence de dépôts de fibrine), à la réaction inflammatoire vasculaire (en suivant l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1), et enfin, en collaboration avec l'équipe du Dr Boulanger (INSERM-U970, Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire, HEGP), à la production de marqueurs et d'acteurs particulièrement novateurs de dysfonction endothéliale : les microparticules endothéliales. Ces problématiques ont été abordées dans un premier temps *in vivo*, dans un modèle d'ischémie cérébrale réalisée chez la souris, puis dans un second temps *in vitro*, sur une lignée de cellules endothéliales cérébrales.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Après un bref rappel sur les AVC, deux chapitres sont consacrés aux altérations vasculaires qui sont au cœur de ce travail : la thrombose et l'inflammation d'une part, et d'autre part, les microparticules endothéliales, de découverte plus récente. Le chapitre III présente les données actuelles concernant la thrombolyse par le rt-PA et le quatrième chapitre une mise au point sur la PARP.

PRÉAMBULE: LES ACCIDENTS VASCULAIRES CÉRÉBRAUX EN QUELQUES MOTS

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) : de l'étiologie à la clinique

→ Définitions et épidémiologie

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit l'AVC comme « *le développement rapide de signes cliniques localisés ou globaux de dysfonction cérébrale avec des symptômes durant plus de 24 heures pouvant conduire à la mort, et sans autre cause apparente qu'une origine vasculaire* ».

Les AVC représentent, à travers le monde, un problème majeur de santé publique avec 16 millions de personnes atteintes chaque année (Strong et al., 2007). En moyenne, un AVC survient toutes les 40 secondes aux Etats-Unis (Writing group members et al., 2010). L'OMS a estimé qu'en 2012, les AVC étaient responsables de 6,7 millions de décès dans le monde et représentaient à eux seuls la 2^{ème} de cause de mortalité après les cardiopathies ischémiques (www.who.int).

La majorité des patients ayant survécu à un AVC garderont des séquelles. En effet, dans les pays occidentaux, les AVC sont la 1^{ère} cause de handicap acquis chez l'adulte et la 2^{ème} cause de démence après la maladie d'Alzheimer. De plus, parmi les survivants, 50% développeront une dépression dans l'année (Pinoit et al., 2006).

En France, l'incidence était de 130 000 nouveaux cas par an en 2005. Selon les estimations, ce chiffre devrait atteindre 143 000 en 2015 du fait du vieillissement de la population (Leys et al., 2008). Néanmoins, la France possède avec le Brésil le taux d'incidence le plus bas dans le monde (Béjot et al., 2009). Actuellement, le taux de prévalence des AVC est estimé à 500 000 personnes. L'âge moyen de survenue d'un AVC chez l'homme est de 71,4 ans, contre 76,5 ans chez la femme. Parmi les victimes, 20% décèdent dans le mois qui suit l'AVC.

Jusqu'à présent, les données épidémiologiques françaises sont issues du registre dijonnais qui existe depuis 1985 ; mais face à l'importance des AVC, deux autres registres de population ont été créés afin d'offrir une vision plus représentative de la maladie sur le territoire français : le registre du Pays de Brest (création en 2008) et le registre de Lille (création en 2010).

Hormis les facteurs de risque non modifiables (âge, sexe, antécédents familiaux d'AVC), la prise en charge des facteurs de risque modifiables (hypertension artérielle, diabète de type 2, hypercholestérolémie, fibrillation auriculaire...) est essentielle pour prévenir la survenue d'un AVC (prévention primaire), mais également pour éviter sa récurrence (prévention secondaire). En effet, le risque de récurrence est très important (Bergman, 2011) : il est supérieur à 10 % 1 an après l'AVC et il atteint près de 40 % après 10 ans (Mohan et al., 2011). La menace d'une récurrence est fortement diminuée grâce notamment à la gestion des facteurs de risque et à la mise en place d'un traitement anti-thrombotique *i.e.* l'aspirine à faible dose (50-325 mg/jour), ou le clopidogrel (75 mg/jour), ou l'association aspirine faible dose/dipyridamole (d'après les recommandations de la Haute Autorité de Santé).

L'ensemble de ces données illustre l'importance des AVC en termes de morbi/mortalité et explique pourquoi les AVC représentent actuellement plus de 7% du budget de la santé en France.

➔ **Classification des AVC**

Il existe différents types d'AVC que l'on peut classer selon leur étiologie (Adams et al., 1993).

- Les **AVC ischémiques** (AVCi) sont les plus fréquents (80% des AVC). Ils surviennent à la suite de l'obstruction d'une artère, ce qui diminue le débit sanguin cérébral dans la zone située en aval de l'occlusion. L'AVCi est à distinguer de l'Accident Ischémique Transitoire (AIT) qui correspond à un épisode bref de dysfonction neurologique provoqué par une ischémie cérébrale (ou rétinienne) mais dont les symptômes régressent en moins d'une heure.

L'essai clinique TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) réalisé en 1993 a identifié 5 sous-types d'AVCi selon leur étiologie (Adams et al., 1993; Warlow et al., 2003) :

- athérosclérose des grosses artères cérébrales (50%),
- occlusion de petites artères, le plus souvent perforantes ; il s'agit d'AVC lacunaires (25%),
- embolie d'origine cardiaque (20%),
- autres origines comme des troubles hématologiques,
- origine indéterminée (causes potentielles multiples ou inconnues).

Dans 70% des AVCi, le territoire irrigué par l'artère carotide est touché ; l'artère sylvienne, encore appelée artère cérébrale moyenne (ACM) est impliquée dans 95% de ces AVC « carotidiens » (Bogousslavsky et al., 1988).

- Les **AVC de type hémorragique** représentent 20% des AVC. La rupture d'un vaisseau cérébral peut survenir lorsqu'il existe une malformation vasculaire (anévrisme), une hypertension artérielle ou au cours d'un traitement anticoagulant. Les hémorragies sont soit intracérébrales et sont appelées hémorragies intra-parenchymateuses (15% des AVC), soit méningées et sont qualifiées de sous-arachnoïdiennes (5% des cas).

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur les AVC de type ischémique, que nous appellerons également « ischémie cérébrale ».

➔ **Manifestations cliniques et prise en charge des AVCi**

L'une des difficultés de la prise en charge des AVC concerne leur diagnostic qui doit être le plus précoce possible afin de limiter les séquelles, telle que l'illustre l'expression « time is brain » (Saver, 2006) (figure 1).

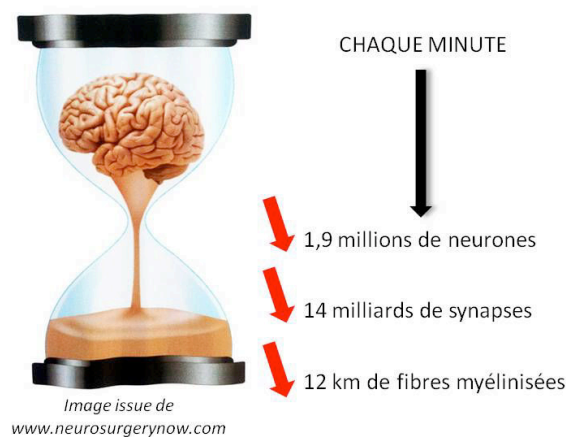


Figure 1 : « Time is brain » (d'après Saver, 2006)

Chaque minute compte à la suite d'une ischémie cérébrale car la mort neuronale et la destruction des synapses et des fibres myélinisées sont irréversibles.

Le diagnostic d'un AVC doit se faire dans les meilleurs délais pour permettre une prise en charge thérapeutique appropriée avant que les dommages cérébraux ne deviennent irréversibles. Cependant, le diagnostic est souvent délicat car les AVC sont caractérisés par un tableau clinique très varié qui dépend du territoire touché, et dont les symptômes sont parfois peu caractéristiques. Il peut s'agir de simples vertiges, céphalées, troubles de l'équilibre, confusion, étourdissements, altération de la vue, perte soudaine du langage ou difficultés à parler, perte de la sensibilité ou

encore troubles de la motricité (paralysie, difficulté de marche) (HAS, Argumentaire 2009, www.has-sante.fr). Aux Etats-Unis, « The National Stroke Association » estime qu'au début des années 2000, près de 40% des américains ne connaissaient pas les symptômes qui caractérisent un AVC (Kaste et al., 2000; Pancioli et al., 1998). En Allemagne, 5% seulement de la population serait capable de reconnaître les signes d'alerte de l'AVC (Kaste et al., 2000). Cette méconnaissance des symptômes constitue le premier frein pour une prise en charge rapide des patients (Pancioli et al., 1998). L'accès à l'imagerie (scanner ou imagerie par résonance magnétique (IRM)) dans les plus brefs délais est également une étape limitante mais indispensable pour confirmer le diagnostic d'AVC et identifier de quel type il s'agit (ischémique ou hémorragique). Dans le cas d'un AVCi, un délai supplémentaire est encore nécessaire afin de déterminer si le patient est éligible à la thrombolyse intraveineuse par le **rt-PA (activateur tissulaire du plasminogène recombinant)**, seul traitement pharmacologique dont disposent actuellement les neurologues pour ce type d'AVC. Hormis de nombreuses contre-indications (voir l'annexe page 201), l'obstacle principal est la fenêtre thérapeutique très étroite de ce traitement puisque d'après son AMM, le rt-PA doit être administré selon les pays dans les 3 heures ou 4,5 heures qui suivent les premiers symptômes. Ce délai semble extrêmement court en regard des difficultés de diagnostic et de prise en charge. Bonnaud et collaborateurs ont montré qu'en France, moins de 40% des patients présentant un AVC arrivent aux urgences dans les 3 heures qui suivent les premiers symptômes (Bonnaud et al., 2005). L'ensemble de ces données explique qu'aujourd'hui, moins de 2% des patients bénéficient d'une thrombolyse (Cronin, 2010; Mahagne, 2008).

Ces dernières années, une prise de conscience du poids considérable de cette maladie dans notre société s'est produite. Les autorités ont mis en place un nombre croissant de campagnes d'information/d'éducation dans le but de sensibiliser le grand public face à l'urgence de cette maladie. Il s'agissait notamment de l'un des objectifs du « Plan d'action national AVC, 2010-2014 » mis en place par le Ministère de la Santé. Les sociétés savantes élaborent également régulièrement des recommandations afin d'optimiser au maximum le circuit de prise en charge des patients. Notons que la naissance de la télémédecine a déjà grandement accéléré ce processus. Enfin, les recherches clinique et préclinique travaillent toutes deux en étroite collaboration afin de mettre à jour de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Physiopathologie des AVCi

→ Évolution spatio-temporelle de la lésion

Chez l'homme, un cerveau adulte contient environ 130 milliards de neurones, reçoit près de 15% du flux sanguin cardiaque et sa consommation en oxygène équivaut à 20% de la consommation de

l'organisme ; pourtant, cet organe ne représente que 2% de la masse corporelle (Heiss, 2011). Les besoins du cerveau en oxygène sont dédiés au métabolisme du glucose, son seul substrat énergétique. Ainsi, du fait de l'importance de ses besoins en oxygène et en glucose, le cerveau est extrêmement dépendant du débit sanguin cérébral (DSC) et vulnérable à l'ischémie. En conditions physiologiques, le DSC est maintenu entre 50 et 60 mL/100 g/min. Au cours d'une ischémie cérébrale, le DSC chute brutalement ; une distinction est cependant faite entre le « **cœur** » de l'ischémie, où le DSC atteint des valeurs inférieures à 7 mL/100 g/min, et la « **pénombre** », située plus en périphérie, pour laquelle le DSC est compris entre 7 et 17 mL/100 g/min (Mehta et al., 2007). Au cœur de l'ischémie, la très sévère chute de débit déclenche des mécanismes de nécrose qui aboutissent à des dommages cellulaires irréversibles. En revanche, dans la zone de pénombre, les cellules sont en souffrance mais restent vivantes et métaboliquement actives grâce au débit sanguin résiduel.

Il est désormais bien établi qu'en cas d'absence de reperfusion ou d'une reperfusion tardive, le cœur de la lésion s'étendra progressivement vers la zone de pénombre (figure 2) (Heiss, 2011). La pénombre constitue donc une véritable cible à sauver lors de la prise en charge de la phase aiguë de l'AVC ; en clinique, la détermination de la taille de la pénombre se fait par imagerie (IRM) (voir pour revue : Paciaroni et al., 2009).

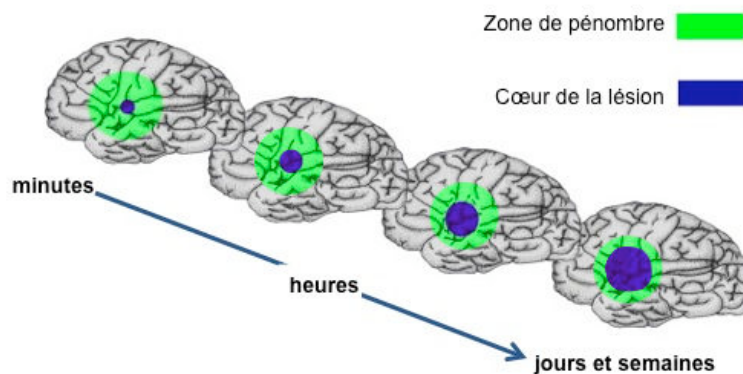


Figure 2 : Evolution spatiale et temporelle des lésions post-ischémiques (d'après Kunz et al., 2010)

➔ Principaux mécanismes délétères au cours de l'ischémie cérébrale

Les mécanismes délétères de l'ischémie sont multiples. Comme l'illustre la figure 3, quelques minutes après l'occlusion du vaisseau qui est à l'origine d'une déplétion énergétique, les premiers mécanismes se mettent en place (**excitotoxicité** et **stress oxydant**). D'autres événements s'installeront un peu plus tardivement comme **l'inflammation** (voir pour revues : Brouns et De Deyn, 2009; Durukan et Tatlisumak, 2007; Pinard et Engrand, 1999).

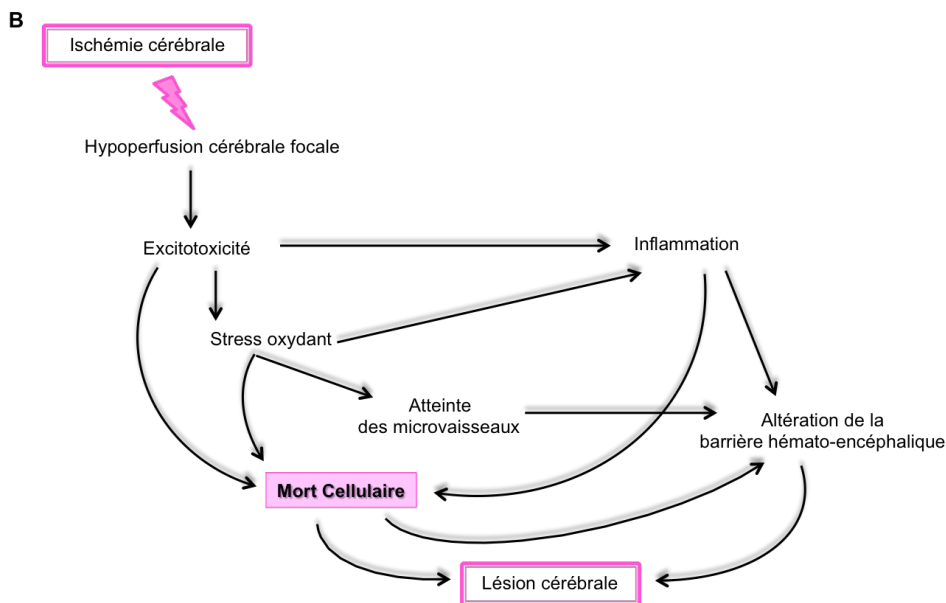
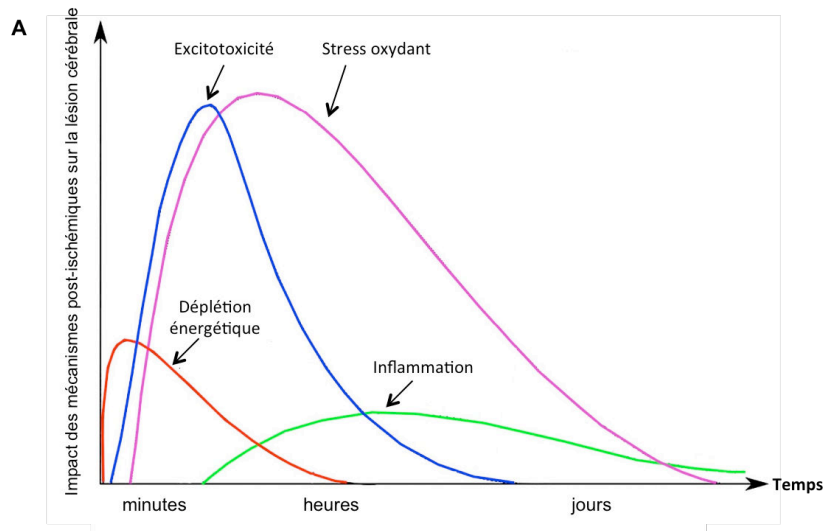


Figure 3 : Physiopathologie de l'ischémie cérébrale

A : Évolution des principaux mécanismes dans le temps (adapté d'après Dirnagl et al., 1999). B : Schématisation de la cascade ischémique (d'après Lakhan et al., 2009).

▪ **Excitotoxicité**

Au cours d'une ischémie cérébrale, la diminution du débit sanguin réduit considérablement l'apport en substrats énergétiques (oxygène et glucose). La déplétion énergétique qui en découle altère le fonctionnement de la pompe Na^+ / K^+ ATPase ce qui perturbe le gradient ionique de part et d'autre de la membrane cellulaire. La dépolarisation neuronale induite par cette modification du gradient ionique déclenche une libération accrue de neuromédiateurs, en particulier de glutamate, principal acide aminé excitateur. De plus, le travail des transporteurs assurant sa recapture est également altéré. Il en résulte une accumulation de glutamate dans le milieu extracellulaire. Celui-ci se fixe à ses récepteurs qui sont de deux types : métabotropique et ionotropique. Il existe trois sous-types de

récepteurs ionotropiques : les récepteurs kaïnate, les récepteurs AMPA (acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque) et les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-Aspartate) (Gielen, 2010). Les récepteurs NMDA jouent en particulier un rôle délétère au cours de l'ischémie cérébrale. Il s'agit de récepteurs très répandus dans le système nerveux central et perméables aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} . Ils sont constitués de cinq sous-unités issues de la transcription de deux familles de gènes : GluN1 et GluN2. La fixation du glutamate sur les récepteurs NMDA entraîne :

- d'une part, une entrée de Na^+ qui est suivie par une entrée passive d'eau dans la cellule, à l'origine d'un œdème cytotoxique. Cet œdème cérébral apparaît très précocement dans la physiopathologie de l'ischémie et son importance est déterminante pour la survie des patients dans les premières heures qui suivent l'AVC (Dirnagl et al., 1999).
- d'autre part, une augmentation de la quantité de calcium intracellulaire, ce qui stimule divers systèmes enzymatiques : des protéases comme les calpaïnes, des endonucléases, la NO-synthase neuronale (NOSn ou NOS-1), la phospholipase A2, les cyclo-oxygénases (COX-1,-2) ou encore la xanthine oxydase. Cette cascade d'événements excitotoxiques est le point de départ d'autres processus délétères post-ischémiques (stress oxydant et inflammation), et conduit également à la mort de la cellule par nécrose (Durukan et Tatlisumak, 2007).

▪ **Stress oxydant**

Lors de l'ischémie cérébrale, certains événements comme le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'activation de la NOSn et des COX ou encore l'infiltration des neutrophiles/macrophages sont à l'origine d'une libération accrue de radicaux libres (Pinard et Engrand, 1999). La surproduction de radicaux libres tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le monoxyde d'azote (NO) et les radicaux hydroxyl (OH^\cdot), ou de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) entraîne un large dépassement des capacités des systèmes antioxydants endogènes de type enzymatique (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase..) et non enzymatique (glutathion, vitamine E/C ...). Le stress oxydant qui en résulte est particulièrement néfaste pour les cellules puisqu'il entraîne une peroxydation des lipides membranaires, une oxydation des protéines, et des cassures de l'ADN, en particulier *via* l'action des anions peroxytrinites (ONOO^-), puissants agents oxydants issus de la combinaison des radicaux O_2^- et NO.

▪ **Inflammation**

Plus tardivement au cours de l'ischémie, s'installe une importante réaction inflammatoire caractérisée par l'infiltration des leucocytes circulants au sein du parenchyme cérébral et par l'activation de la microglie (Q. Wang et al., 2007).

A la suite de l'excitotoxicité et du stress oxydant, l'augmentation des taux intracellulaires de calcium, la production de NO et de radicaux libres oxygénés ainsi que la nécrose participent à l'activation de facteurs de transcription, tels que HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) et NF-κB (nuclear factor-κB), facteurs clés de l'inflammation post-ischémique (Dirnagl et al., 1999). Ils entraînent notamment une augmentation de la synthèse de NO et de l'expression de la COX-2, ainsi qu'une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF et IL1-β. Ces dernières sont impliquées dans l'activation de la microglie, elle-même productrice de cytokines (figure 4). L'ensemble des cytokines libérées induit l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, notamment ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1), et les P- et E-sélectines. Ces molécules permettent l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium, ce qui entraîne leur infiltration au sein du parenchyme cérébral. Quelques heures après l'ischémie, les neutrophiles sont les premiers à arriver dans le tissu ischémié. Ils sont suivis par les monocytes après quelques jours (Durukan et Tatlisumak, 2007). Les leucocytes infiltrés ainsi que la microglie sont des réservoirs importants de médiateurs pro-inflammatoires tels que les métalloprotéases de la matrice (MMP), la NOS inductible (NOSi ou NOS-2), la COX-2, et les cytokines, qui participent à l'œdème cérébral, aux hémorragies et à la maturation de la lésion post-ischémique.

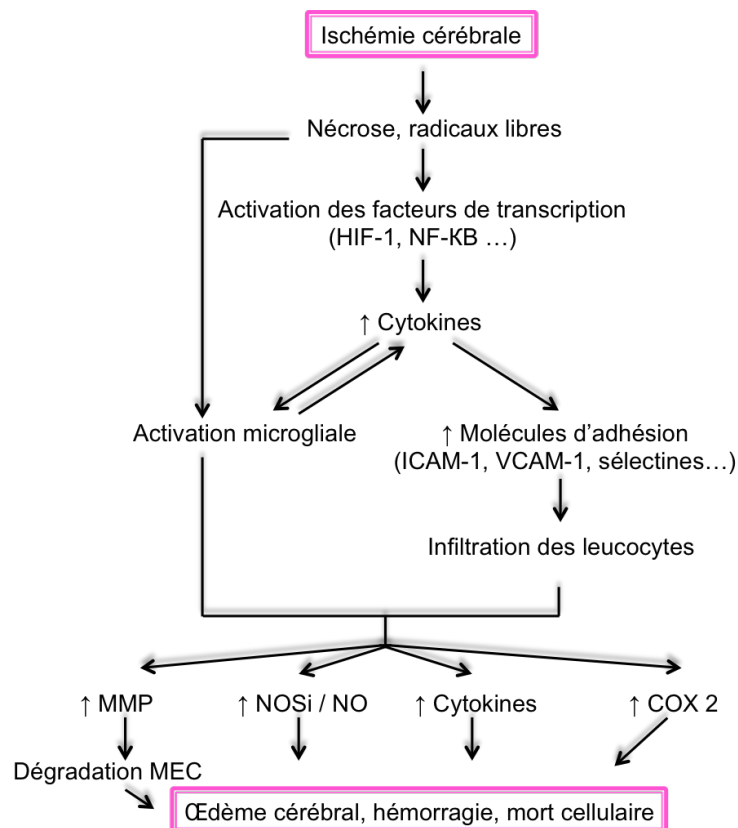


Figure 4 : Mécanismes inflammatoires post-ischémiques (adaptée de Q. Wang et al., 2007)

HIF-1 : hypoxia inducible factor 1 ; NF-κB : nuclear factor-κB ; ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1 ; VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1 ; MMP : métalloprotéases de la matrice ; NOSi : NO synthase inductible ; COX 2 : cyclo-oxygénase de type 2 ; MEC : matrice extracellulaire

Les mécanismes physiopathologiques que nous venons de décrire sont particulièrement délétères pour l'ensemble des cellules cérébrales, et notamment pour les cellules endothéliales (Del Zoppo, 1994). Au cours de l'ischémie cérébrale, le système microvasculaire est altéré et une dysfonction endothéliale est observée.

PREMIER CHAPITRE :

LES ATTEINTES MICROVASCULAIRES AU COURS DE L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE

L'endothélium fait partie intégrante de ce que l'on appelle « la triade de Virchow » (Del Zoppo, 2008). Cette triade comprend (1) le vaisseau et l'endothélium qui le borde, (2) le flux sanguin et les forces de cisaillement exercées par le flux sur ce vaisseau, (3) les cellules sanguines et les facteurs circulants de la coagulation. Au cours de l'ischémie cérébrale, la dysfonction endothéliale ne concerne pas uniquement l'endothélium mais affecte les trois membres de cette triade.

La définition de la dysfonction endothéliale a longtemps été restreinte à « une altération de la vasorelaxation endothélium-dépendante » mettant en cause une diminution du NO. Depuis, il est admis que la dysfonction endothéliale fait également référence à une perturbation des propriétés anti-inflammatoires et anticoagulantes de l'endothélium (Miller et al., 2010; Endemann et Schiffrin, 2004). Au cours de l'ischémie cérébrale, la dysfonction endothéliale met ainsi en jeu des phénomènes pro-inflammatoires et thrombogènes ainsi qu'une augmentation de la perméabilité des microvaisseaux au contenu intravasculaire (Q. Wang et al., 2007; Del Zoppo, 1997, 1994).

Ces phénomènes **pro-thrombogènes** et **pro-inflammatoires** qui contribuent aux atteintes microvasculaires post-ischémiques agissent en étroite relation et peuvent par ailleurs participer au **phénomène de « no reflow »** ; ils font donc l'objet de ce premier chapitre. Les **microparticules (MPs)** qui sont tant des marqueurs que des acteurs de la dysfonction endothéliale, et qui constituent un pan important de cette thèse, seront ensuite traitées dans un chapitre à part entière.

I. Thrombose post-ischémique : dépôts de fibrine

La dysfonction de l'endothélium à la suite d'un évènement ischémique, tout particulièrement lorsque l'ischémie est suivie d'une reperfusion, le rend pro-thrombogène. Les phénomènes de thrombose qui en découlent consistent en deux principaux mécanismes : (1) l'activation et l'agrégation des plaquettes, (2) l'activation de la cascade de la coagulation qui met en jeu la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, et qui aboutit à la formation de dépôts de fibrine dans la lumière des vaisseaux (figure 5). C'est à ce deuxième phénomène que je me suis plus particulièrement intéressée au cours de mes travaux de thèse.

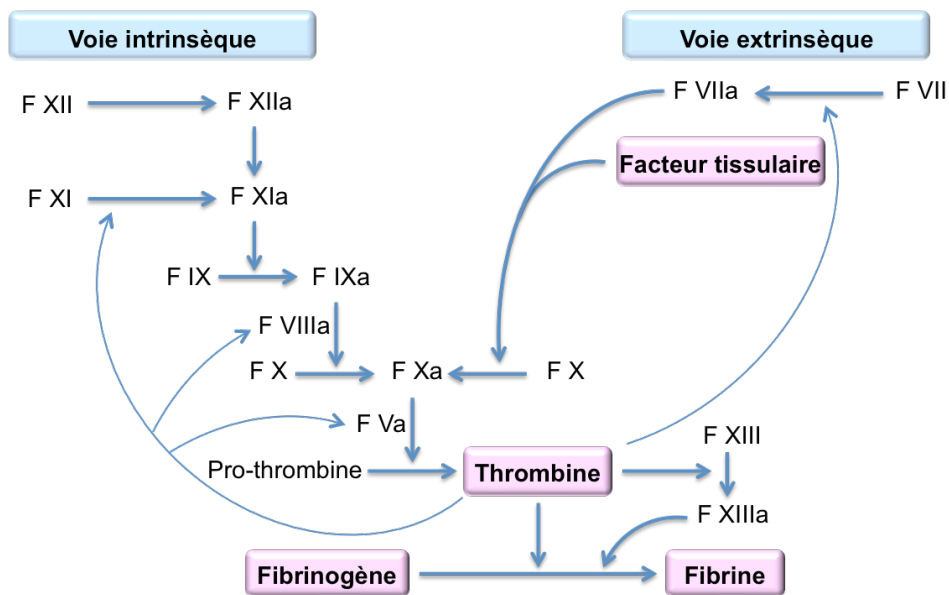


Figure 5 : Schéma des étapes de la coagulation (d'après Y. Wang et al., 2014 ; Mann, 2011)

F : Facteur de la coagulation

1. Mécanismes de formation de la fibrine

La fibrine est formée à partir du fibrinogène grâce à l'action de la thrombine.

Le fibrinogène est une glycoprotéine de 340 kDa synthétisée dans le foie, dont les concentrations plasmatiques chez l'homme sont comprises entre 1,5 et 3 g/l. Au cours de situations inflammatoires, ces concentrations peuvent atteindre des valeurs allant jusqu'à 7 g/l (Wolberg, 2012).

Le fibrinogène présente une structure complexe constituée de deux exemplaires de 3 chaînes polypeptidiques : les chaînes A α , B β et γ (figure 6). Les chaînes A α et B β possèdent respectivement à leurs extrémités N-terminales les fibrinopeptides A et B. Les 3 chaînes sont reliées entre elles dans leurs parties N-terminales par des ponts disulfures, ce qui forme ainsi le domaine central E. Les extrémités C-terminales des chaînes B β et γ forment quant à elles, deux domaines D situés de chaque côté du domaine E. Les domaines D et E sont ainsi reliés par les 3 chaînes peptidiques entrelacées les unes aux autres (Mosesson, 2005).

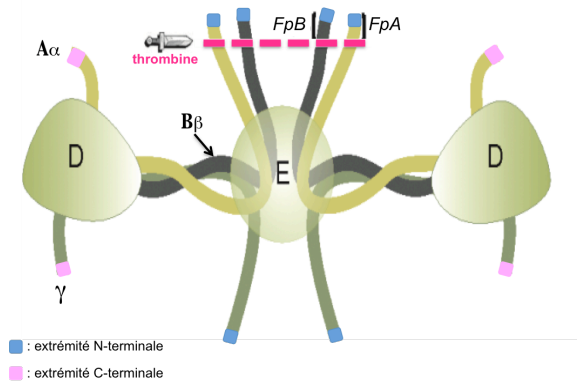


Figure 6 : Structure du fibrinogène (modifiée d'après Jennewein et al., 2011)

FpA : fibrinopeptide A ; FpB : fibrinopeptide B

La thrombine clive tout d'abord les fibrinopeptides A et B des chaînes A α et B β du fibrinogène (les sites de clivage sont représentés sur la figure 6). Cette étape génère des monomères de fibrine qui présentent désormais des sites de polymérisation accessibles (figure 7.A). Par conséquent, ces monomères s'associent en quinconce (1 domaine E d'un monomère avec 2 domaines D de 2 autres monomères) et forment des protofibrilles. La thrombine intervient de nouveau et active le facteur XIII, qui exerce un rôle essentiel puisqu'il catalyse la formation de liaisons covalentes entre deux domaines D au niveau des chaînes γ des protofibrilles, stabilisant ainsi les polymères de fibrine. A côté de ces dimères γ - γ , se formeront également par la suite des dimères α - α .

A l'issue de ces étapes, un réseau volumineux, complexe et extrêmement structuré est formé, à l'origine d'un caillot stable de fibrine (figure 7.B) (Jennewein et al., 2011; Mosesson, 2005).

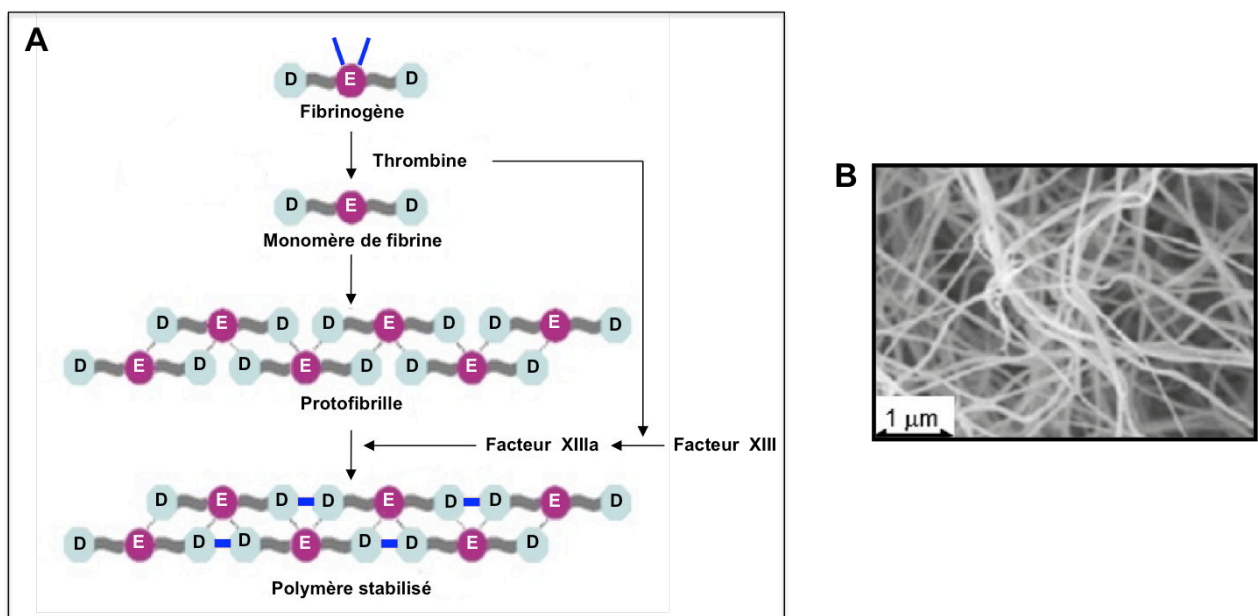


Figure 7 : Formation de la fibrine à partir du fibrinogène

A: formation d'un polymère de fibrine (adapté de Nougier et Marijon, 2012). B : image obtenue par microscopie électronique d'un réseau de fibrine formant un caillot (d'après Falvo et al., 2010).

La thrombine impliquée dans la synthèse de la fibrine est une sérine protéase qui existe sous 3 formes (α , β , γ) mais seule la forme α est active. Cette protéine est constituée de 2 chaînes reliées par un pont disulfure : une chaîne légère (chaîne A, 36 acides aminés) et une chaîne lourde (chaîne B, 259 acides aminés) qui comporte le site actif protéolytique.

L'activation de la thrombine met en jeu d'autres acteurs importants de la cascade de la coagulation et en particulier, **le facteur tissulaire**. Le facteur tissulaire est une glycoprotéine transmembranaire périvasculaire, présente dans le système nerveux sur les microvaisseaux de diamètre supérieur à 10 μm . A la suite d'une ischémie, l'intégrité des cellules endothéliales étant altérée, le sang entre en contact avec le sous-endothélium et le facteur VIIa circulant s'associe avec le facteur tissulaire (Del Zoppo, 1997). Le complexe ainsi formé active le facteur X en facteur Xa qui transforme lui-même la pro-thrombine en thrombine et l'active (figure 5).

La thrombine participe à la formation du caillot, non seulement lors de la formation de fibrine mais également lors de l'activation et de l'agrégation plaquettaire. En effet, en se fixant sur les récepteurs plaquettaires PAR-1 et -4 (proteinase activated receptors), la thrombine participe à l'amplification de l'activation des plaquettes.

2. Dépôts de fibrine dans les microvaisseaux après une ischémie cérébrale

a) Études précliniques

Plusieurs études précliniques ont mis en évidence une accumulation de dépôts de fibrine dans la microcirculation après une ischémie cérébrale (Kraft et al., 2013; Zhang et al., 2001). Okada et al. (1994a) ont montré qu'il existe une accumulation de fibrine après une ischémie chez le babouin, qu'elle soit permanente ou transitoire. Dans leur modèle d'ischémie transitoire, ils ont observé que la quantité de dépôts de fibrine augmentait avec la durée de reperfusion, la quantité maximale de fibrine ayant été retrouvée après 24 heures de reperfusion. Ces travaux ont montré non seulement que la fibrine s'accumule à l'intérieur des microvaisseaux d'un diamètre principalement compris entre 7,5 et 30 μm , mais également que la fibrine est présente dans le parenchyme cérébral. Le fibrinogène, précurseur de la fibrine, serait donc capable de franchir l'espace péri-vasculaire grâce à l'altération de la barrière-hémato-encéphalique (BHE) et de se transformer en fibrine dans le parenchyme (Okada et al., 1994a). La présence de fibrine extravasculaire a également été observée après 4 heures d'ischémie chez le rat (Z. G. Zhang et al., 1999). Plus récemment, Zhang et al. (2012) ont mis au point une technique d'imagerie originale appelée « NIRF imaging » pour « Near-Infrared Imaging of Fibrin » qui permet de détecter de manière non invasive chez la souris des dépôts de

fibrine dans la microcirculation. Dès 8 heures après une ischémie induite par l'injection d'un caillot homologue, la quantité de fibrine augmente de manière constante avec le temps. Bien que ce modèle d'ischémie ainsi que la technique de révélation de la fibrine soient bien différents de ceux utilisés par Okada et collaborateurs, la valeur maximale de fibrine est, de manière très intéressante, de nouveau retrouvée 24 heures après l'ischémie ; puis elle diminue progressivement mais reste significativement élevée jusqu'à 4 jours. Enfin, il a été montré que la fibrine participe aux dommages post-ischémiques puisqu'il existe une corrélation entre la quantité de fibrine et le volume de lésion (Zhang et al., 2012; Kleinschnitz et al., 2006).

L'importance du facteur tissulaire dans la formation de la fibrine a été mise en évidence dans des modèles d'ischémie cérébrale avec reperfusion, dans lesquels l'administration d'anticorps bloquant le facteur tissulaire a permis de diminuer les dépôts de fibrine (Okada et al., 1994a; Thomas et al., 1993). D'autres mécanismes peuvent participer aux dépôts de fibrine après une ischémie ; l'étude de Z. G. Zhang et al. (1999) a notamment mis en évidence un lien avec l'augmentation de l'expression du gène codant pour PAI-1 (type 1 plasminogen activator inhibitor), une protéine qui s'oppose à la fibrinolyse.

b) Études cliniques

En 1996, Heye et Cervos-Navarro ont recherché par histologie la présence de micro-thrombo-embolies (MTE, constitués principalement de fibrine) après autopsie de patients décédés dans le mois suivant un AVCi. Ils ont ainsi pu mettre en évidence l'accumulation de fibrine dans les vaisseaux de l'hémisphère ischémié. Des MTE ont également été retrouvés en dehors du territoire irrigué par le vaisseau initialement occlus, et notamment dans l'hémisphère controlatéral. De manière intéressante, ces travaux montrent également que la fréquence et la distribution des MTE dans le cerveau sont étroitement liées à l'étiologie de l'AVC. En effet, la quantité de fibrine après un AVC embolique est faible et nettement inférieure à celle qui fait suite à un AVC thrombotique ou thrombo-embolique. Ce constat suppose que lors d'un AVC embolique, il y aurait moins de production de MTE et / ou une plus grande sensibilité de ceux-ci face aux stimuli de lyse. Cette sensibilité serait liée à une différence de composition du caillot lors d'un AVC embolique et d'un AVC thrombotique/thrombo-embolique (Heye et Cervos-Navarro, 1996).

II. Inflammation et vaisseaux : ICAM-1 et VCAM-1

Comme nous l'avons vu précédemment, la réaction inflammatoire post-ischémique se met en place dès les premières heures qui suivent l'ischémie et perdure pendant plusieurs jours. Cet environnement inflammatoire active notamment les cellules endothéliales et entraîne une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion à leur surface. Ces molécules permettent le recrutement des leucocytes, leur adhésion, puis leur passage à travers les cellules endothéliales afin d'infiltrer le parenchyme cérébral. De nombreuses études ont montré le rôle primordial de ces molécules d'adhésion dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale (Yilmaz et Granger, 2008; Frijns et Kappelle, 2002).

Il existe trois classes de molécules d'adhésion : les sélectines (L-, E- et P-sélectines), les intégrines et la superfamille des immunoglobulines qui comprend VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 et -2 (intercellular adhesion molecule-1,-2), et PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) (Lakhan et al., 2009; Q. Wang et al., 2007; Huang et al., 2006). Parmi ces molécules d'adhésion, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ICAM-1 et VCAM-1. Ces deux molécules endothéliales interviennent dans la phase d'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium, et sont des marqueurs de choix pour l'étude de la réaction inflammatoire post-ischémique.

1. ICAM-1 et VCAM-1 : structure et ligands

a) ICAM-1

ICAM-1 (CD54) est une glycoprotéine transmembranaire composée de 532 acides aminés. Bien que sa masse moléculaire soit de 58 kDa, la détection de cette protéine par Western-Blot se fait en pratique autour de 99 kDa du fait de ses 8 sites de N-glycosylation, (base de données Uniprot KB ; Scott et al., 2013). Sa partie extracellulaire N-terminale est formée de 5 boucles, appelées domaines « Ig-like », reliées entre elles par des ponts disulfures. Le domaine D1 contient le site de liaison pour le ligand leucocytaire LFA-1 (leukocyte function associated molecule-1) et le domaine D3 le site de fixation de Mac-1 (macrophage antigen-1). A côté de ces deux ligands leucocytaires, ICAM-1 peut également se lier aux plaquettes par fixation, *via* le fibrinogène, à la protéine plaquettaire GPIIb/IIIa. ICAM-1 est exprimé de manière constitutive en faible quantité par les cellules endothéliales et par d'autres types cellulaires (leucocytes, cellules épithéliales, fibroblastes). Dans un environnement inflammatoire, son expression est augmentée par des cytokines telles que l'IL-1 α et le TNF, notamment *via* le facteur de transcription NF- κ B. ICAM-1 existe également sous une forme soluble, ICAM-1s.

Notons qu'il existe un autre type d'ICAM, ICAM-2 (CD102). Cette protéine, également exprimée de manière constitutive par les cellules endothéliales et les plaquettes, participe à l'adhésion des leucocytes. En revanche, contrairement à ICAM-1, l'expression d'ICAM-2 n'est pas augmentée dans un environnement inflammatoire.

b) VCAM-1

VCAM-1 (CD106) est une protéine transmembranaire de 90 kDa, retrouvée de manière constitutive en faible quantité à la surface des cellules endothéliales. Sa partie extracellulaire est constituée de 7 domaines « Ig-like ». Son expression est, tout comme ICAM-1, inductible puisqu'elle est augmentée sous l'effet du TNF et de l'IL-1. Le principal ligand de VCAM-1 est VLA-4 (very late antigen-4 ou $\alpha 4\beta 1$) qui est retrouvé sur les monocytes et les lymphocytes.

Notons qu'il existe comme pour ICAM-1 une forme soluble de la protéine (VCAM-1s).

2. ICAM-1 / VCAM-1 et ischémie cérébrale

a) Etudes précliniques

Plusieurs études se sont intéressées à l'expression d'ICAM-1 dans des modèles d'ischémie cérébrale réalisés chez le rat. Wang et Feuerstein (1995) ont montré une augmentation de la quantité d'ARNm d'ICAM-1 dès 3h après une ischémie permanente. Cette quantité est maximale entre 6 heures et 12 heures, et persiste jusqu'à 5 jours après l'ischémie. L'augmentation de l'ARNm d'ICAM-1 semble plus précoce dans un modèle d'ischémie transitoire puisqu'elle devient significative dès la première heure qui suit la reperfusion (Wang et al., 1994), bien qu'une étude plus récente de Vemuganti et al. (2004) montre, dans ce même modèle, que l'ARNm d'ICAM-1 est significativement augmenté entre 3 heures et 72 heures après la reperfusion, avec une augmentation maximale à 24 heures. Chez la souris, les taux d'ARNm d'ICAM-1 sont également augmentés jusqu'à 5 jours, que ce soit après une ischémie transitoire ou permanente (Zhou et al., 2013).

Zhang et al. (1995) se sont intéressés à l'expression de la protéine ICAM-1 dans un modèle d'ischémie transitoire chez le rat. Ils ont montré une hausse importante d'ICAM-1 dès 24 heures et jusqu'à 4 jours.

Le rôle délétère d'ICAM-1 à la suite de l'ischémie cérébrale a été montré par plusieurs études. Ces études ont mis en évidence un effet neuroprotecteur (diminution de l'apoptose, du volume de lésion et du déficit neurologique) après blocage de la protéine par un anticorps (Chopp et al., 1996; Bowes et al., 1993) ou de son ARNm par des oligonucléotides antisens (Vemuganti et al., 2004), ou par le biais de souris ICAM-1^{-/-} (Connolly et al., 1996a).

Concernant VCAM-1, seules quelques études réalisées chez l'animal se sont intéressées à son évolution post-ischémique. Chez la souris, l'ARNm de VCAM-1 est significativement augmenté jusqu'à 5 jours après une ischémie transitoire mais aussi permanente (Zhou et al., 2013). Néanmoins, à la suite d'une ischémie transitoire chez le rat, Vemuganti et al. (2004) n'ont pas décrit de modification du taux d'ARNm de VCAM-1. D'autres études se sont intéressées à l'expression de la protéine. Justicia et al. (2006) ont notamment mis en évidence une augmentation de l'expression de VCAM-1 16 heures et 24 heures après une ischémie transitoire chez le rat. Au sein de notre équipe de recherche, Fréchou et al. (2013) ont étudié la cinétique d'expression de VCAM-1 par immunohistochimie dans un modèle d'ischémie transitoire chez la souris. Dans cette étude, l'expression de VCAM-1 tend à augmenter 6 heures après l'ischémie et cette augmentation devient significative à 24 heures, à la fois dans le cortex et dans le striatum. L'expression de VCAM-1 est revenue à l'état basal à 72 heures. Plus récemment, Gauberti et al. (2013) se sont intéressés à l'expression de VCAM-1 par IRM. Ils ont montré qu'après une ischémie transitoire chez la souris, l'expression de la protéine est augmentée à 24 heures puis diminue progressivement jusqu'à 5 jours. De plus, cette étude met en évidence qu'après une ischémie permanente, la surexpression de VCAM-1 persiste jusqu'à 5 jours.

Le rôle de VCAM-1 dans l'ischémie cérébrale semble moins bien établi que celui d'ICAM-1. Une étude réalisée chez le rat a montré qu'un antagoniste des récepteurs aux leucotriènes entraîne une neuroprotection qui est associée notamment à une diminution de l'expression post-ischémique de VCAM-1 (Zhang et Wei, 2003). En revanche, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre VCAM-1 n'a pas permis de protéger des dommages de l'ischémie chez le rat (Justicia et al., 2006).

b) Etudes cliniques

Chez les patients victimes d'AVC, une augmentation des formes solubles d'ICAM-1 (ICAM-1s) et de VCAM-1 (VCAM-1s) a pu être observée dès les premières heures qui suivent l'ischémie et pendant plusieurs jours. Ces protéines solubles ont été détectées dans le plasma et dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients (Ehrensperger et al., 2005; Selaković et al., 2003; Lindsberg et al., 1996), et cette augmentation est corrélée avec la sévérité de l'ischémie. Par ailleurs, l'expression de la forme membranaire de VCAM-1 a également été mise en évidence au niveau cérébral lors d'analyses post-mortem de patients victimes d'AVC ischémiques (Blann et al., 1999).

De plus, il a été montré que plus les taux plasmatiques de VCAM-1s sont faibles dans les 4 premiers jours qui suivent l'AVC, meilleure sera la récupération neurologique (Blum et al., 2006). Il existe également une corrélation entre des quantités élevées d'ICAM-1s et une mortalité précoce (Rallidis

et al., 2009). Enfin, il a été montré que les taux élevés de VCAM-1s sont prédictifs d'une récurrence d'un événement cardiovasculaire (Castillo et al., 2009; Campbell et al., 2006).

L'ensemble de ces résultats illustre le rôle majeur d'ICAM-1 et de VCAM-1 dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale.

III. Des liens entre inflammation et thrombose

Il est à noter qu'il existe une relation étroite entre l'inflammation et les phénomènes de thrombose décrits précédemment. L'inflammation est capable d'orienter le système hémostatique vers un état prothrombotique et de manière réciproque, la coagulation est capable de stimuler la réaction inflammatoire. Plusieurs acteurs sont notamment impliqués dans cette relation croisée (figure 8):

- Le facteur tissulaire est induit lors de l'inflammation et il initie la cascade de la coagulation.
- La thrombine intervient dans la cascade de la coagulation en formant la fibrine, et elle active les cellules endothéliales par la fixation à ses récepteurs PAR. La thrombine induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion comme ICAM-1, ainsi que le recrutement des leucocytes (Levi et al., 2004; Sugama et al., 1992).
- Le fibrinogène et / ou la fibrine (Fg/Fn) contribue au processus pro-inflammatoire (Jennewein et al., 2011). Le Fg/Fn favorise la migration des leucocytes et augmente l'expression de cytokines et la libération de radicaux libres par les cellules endothéliales et les leucocytes. De plus, ICAM-1 exprimé par les cellules endothéliales est un récepteur du fibrinogène. En s'y fixant, le Fg participe à l'interaction des leucocytes avec l'endothélium. Enfin, les produits de dégradation de la fibrine mais également du fibrinogène générés lors de la coagulation/thrombolyse semblent eux aussi être impliqués dans la réaction inflammatoire (recrutement des leucocytes, libération de cytokines) (Jennewein et al., 2011).
- Les plaquettes jouent aussi un rôle important dans la relation thrombose/inflammation. Lorsque l'endothélium est lésé, les plaquettes peuvent être activées par des médiateurs pro-inflammatoires ou encore par la thrombine. Les plaquettes activées sont capables d'accélérer la formation de fibrine. De plus, il a été montré que l'expression de la P-sélectine sur les plaquettes entraîne d'une part, une accumulation de leucocytes responsables de la

formation de dépôts de fibrine (Palabrica et al., 1992), et d'autre part, une augmentation de l'expression du facteur tissulaire sur les monocytes (Levi et al., 2004). Notons qu'ICAM-1 joue également un rôle essentiel dans l'adhésion des plaquettes à l'endothélium (Massberg et al., 1999).

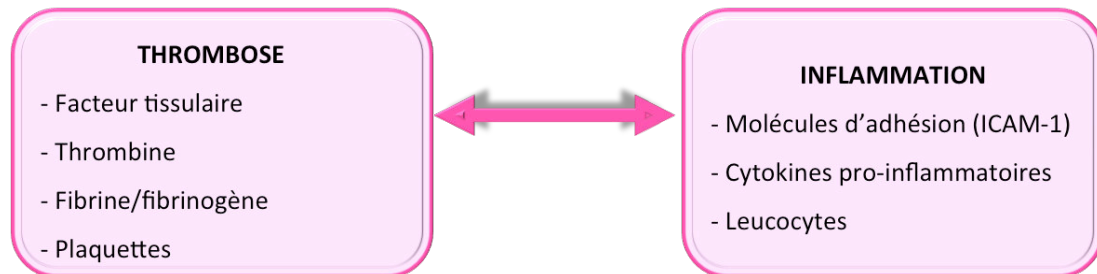


Figure 8 : Relation croisée entre les mécanismes pro-thrombotiques et pro-inflammatoires

IV. Hypoperfusion et phénomène de « no reflow »

Depuis quelques années, des données cliniques et précliniques s'accordent à distinguer à la suite de l'ischémie cérébrale la notion de recanalisation de la notion de reperfusion. La recanalisation d'une artère occluse correspond à la ré-ouverture de la lumière de ce vaisseau, tandis que la reperfusion équivaut à la restauration du DSC dans le réseau vasculaire distal (Khatri et al., 2005).

C'est en 1968 qu'Ames et al. ont remarqué pour la première fois qu'après de brèves périodes d'ischémie chez le lapin suivies d'une recanalisation mécanique du vaisseau, la reperfusion de certaines zones du cerveau était incomplète voire inexistante. Depuis, plusieurs études réalisées dans d'autres modèles animaux se sont intéressées à ce phénomène que l'on appelle **le phénomène de « no reflow »** (voir pour revue Dalkara et Arsava, 2012). Ces études ont tenté de préciser les mécanismes à l'origine de ce phénomène, et les altérations vasculaires post-ischémiques sembleraient en être une des causes principales :

- Des études précliniques ont notamment montré qu'il existe à la suite d'une ischémie cérébrale transitoire, une obstruction des microvaisseaux, principalement au niveau des capillaires (Little et al., 1976, 1975; Crowell et Olsson, 1972). Des travaux, en particulier ceux de Little et al. (1976), ont montré que cette obstruction, observée dès 3 heures après la fin de l'ischémie, est liée à un gonflement d'une part des cellules endothéliales, et d'autre part des astrocytes. Z. G. Zhang et al. (1999) ont confirmé l'implication des astrocytes en utilisant chez le rat une technique d'imagerie par fluorescence en 3 dimensions (LSCM ou laser scanning confocal microscopy) qui a permis de montrer que l'augmentation de la réactivité

des astrocytes est concomitante à une diminution de la perfusion, 1 heure après le début de l'ischémie.

- Par ailleurs, la participation des péricytes au phénomène de « no reflow » a récemment été soulignée. En effet, une étude réalisée par Yemisci et al. (2009) a mis en évidence que les péricytes en contact avec les microvaisseaux sont contractés lors d'une ischémie, et que cette contraction perdure malgré la recanalisation de l'artère. Ce phénomène contribuerait donc au rétrécissement de la lumière des vaisseaux.

- Le rétrécissement de la lumière des microvaisseaux par l'œdème cérébral et le gonflement des astrocytes et des péricytes est aggravé par une accumulation dans le vaisseau d'érythrocytes, de neutrophiles, de plaquettes et de dépôts de fibrine. En effet, après une ischémie suivie d'une recanalisation, des agrégats de leucocytes ont été retrouvés piégés dans les microvaisseaux. Logés dans ces agrégats, des plaquettes et des dépôts de fibrine formés *in situ* ont également été détectés (Del Zoppo et al., 1991); les zones d'hypoperfusion ont été associées à la présence de ces dépôts intravasculaires de fibrine (Z. G. Zhang et al., 1999).
Par ailleurs, des stratégies utilisant des anticorps dirigés contre la E-sélectine, la P-sélectine, le facteur tissulaire, ou encore des souris génétiquement modifiées ICAM-1^{-/-} ou P-sélectine^{-/-}, ont montré une amélioration de la reperfusion cérébrale après une ischémie transitoire, et s'opposent donc au phénomène de « no reflow » (Huang et al., 2000; Connolly et al., 1997, 1996a; Thomas et al., 1993).

- Une autre raison de l'hypoperfusion observée après recanalisation serait la présence de micro-embolies secondaires issues de la fragmentation du caillot initial. En effet, plusieurs études précliniques ont rapporté la présence de micro-embolies en aval du site de l'occlusion (Wang et al., 2006, 2001).

- Notons que le phénomène de « no reflow » est également renforcé par la perte de vasoréactivité de l'endothélium à la suite de l'ischémie cérébrale. En effet, des études expérimentales ont mis en évidence une diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante à la suite d'ischémies permanente et transitoire, qui serait liée à une diminution de la libération du NO (Rosenblum, 1998, 1997; Rosenblum et Wormley, 1995; Mayhan et al., 1988;).

- Enfin, la lame basale semble elle aussi jouer un rôle dans le « no reflow ». Après une ischémie cérébrale, certains de ses composants, tels que le collagène IV et la laminine, sont dégradés par les MMP notamment. Cette dégradation conduit à la perte des propriétés mécaniques du vaisseau qui devient moins résistant et tend à se collapsier plus facilement. De plus, la destruction de la lame basale entraîne le détachement des cellules endothéliales des pieds astrocytaires (Wang et Shuaib, 2007).

A côté des phénomènes pro-thrombogènes et pro-inflammatoires détaillés dans ce chapitre, les microparticules endothéliales ont aussi été décrites plus récemment comme des acteurs de la dysfonction endothéliale ; elles font donc l'objet du chapitre suivant.

DEUXIÈME CHAPITRE : LES MICROPARTICULES

Introduction

Les microparticules (MPs) ont été décrites pour la première fois en 1967 par Wolf (Wolf, 1967). Présentées comme étant de simples débris cellulaires issus de plaquettes et dépourvus d'activité biologique, elles ont été appelées « platelet dust » (« poussière plaquettaire »). Par la suite, des MPs d'autre origine cellulaire ont été découvertes et ont suscité un intérêt croissant dans des domaines aussi variés que les maladies thrombotiques, immuno-inflammatoires, neurologiques, cardiovasculaires et cancéreuses. Les MPs se sont ainsi révélées être de véritables entités subcellulaires dotées de nombreuses fonctions biologiques.

Les MPs sont des vésicules membranaires de taille comprise entre 0,1 et 1 μm , produites suite à une activation cellulaire ou lors de l'apoptose, et libérées dans le milieu extracellulaire. Elles proviennent principalement des cellules hématopoïétiques (leucocytes, plaquettes, érythrocytes), endothéliales et musculaires lisses (Herring et al., 2013), mais également de la plupart des cellules cérébrales (progéniteurs neuronaux, neurones, microglie, astrocytes, oligodendrocytes) (Borgiani et al., 2012; Bianco et al., 2009; Schiera et al., 2007; Marzesco et al., 2005; Bianco et al., 2005; Scolding et al., 1989), ainsi que des cellules tumorales. Les MPs sont libérées dans le milieu extracellulaire et peuvent être retrouvées dans le sang au sein duquel près de 80% des MPs sont d'origine plaquettaire, alors que les MPs endothéliales (MPE) ne représentent que 5 à 15% du total (Markiewicz et al., 2013; Horstman et Ahn, 1999). Les MPs sont également retrouvées dans d'autres liquides biologiques tels que le liquide céphalo-rachidien, l'urine et la salive (Doeuvre et al., 2009), et sont aussi présentes au niveau des plaques d'athérosclérose (Leroy et al., 2007).

I. Mécanismes de formation des microparticules

1. Vésiculation

Les phospholipides membranaires d'une cellule au repos sont répartis de manière asymétrique. Les phospholipides chargés positivement (phosphatidylcholine, sphingomyéline) sont majoritairement présents au niveau du feuillet externe de la bicouche lipidique, tandis que les phospholipides anioniques ou aminophospholipides (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine) sont localisés préférentiellement sur le feuillet interne. Le maintien de cette répartition est assuré par l'équilibre fonctionnel entre trois enzymes : les scramblases, les floppases et les flippases. Les scramblases et les floppases sont inactives, et les flippases sont, au contraire, en permanence activées afin de permettre l'internalisation des phospholipides anioniques. La stabilité physique de la membrane plasmique est également renforcée par la présence, sous la bicouche lipidique, du cytosquelette polymérisé.

Au cours de l'activation ou de l'apoptose des cellules, la très forte augmentation des taux intracellulaires de calcium conduit à une perturbation de l'équilibre établi entre les enzymes précédemment décrites. Ainsi, les scramblases et les floppases deviennent actives alors que les flippases sont inhibées. Le remaniement des phospholipides membranaires qui en découle aboutit à la translocation de la phosphatidylsérine du feuillet interne vers le feuillet externe. De manière concomitante, l'augmentation brutale du calcium intracellulaire est à l'origine de l'activation d'enzymes comme la calpaïne et la gelsoline, responsables d'une protéolyse du cytosquelette. L'ensemble de ces phénomènes aboutit à la déstabilisation de la membrane et au bourgeonnement de la cellule, puis à la libération de MPs dans le milieu extracellulaire (Morel et al., 2011) (figure 9).

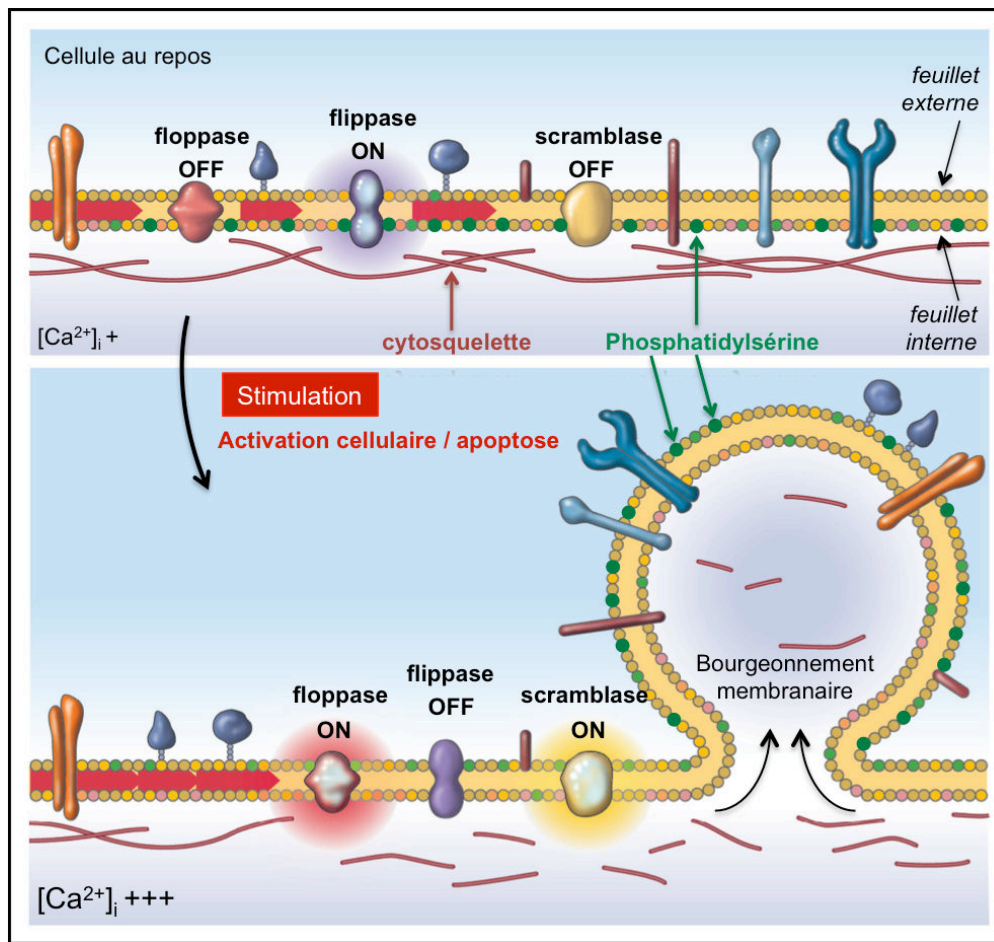


Figure 9 : Mécanismes de formation des MPs (adaptée d'après Hugel et al., 2005)

2. Mécanismes moléculaires

A l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires à l'origine de la production des MPs *in vivo* sont encore peu décrits dans la littérature. En revanche, un nombre croissant d'études réalisées *in vitro* a permis ces dernières années de préciser les stimuli et les mécanismes moléculaires de la vésiculation. En effet, il est possible de produire des MPs à partir de cultures de cellules, notamment endothéliales, soumises à différents stimuli : TNF, LPS, thrombine, inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI), protéine C réactive, camphothécine, radicaux libres dérivés de l'oxygène, ou par des conditions particulières de flux (shear stress)... (Leroy et al., 2010).

En ce qui concerne les mécanismes moléculaires généraux de vésiculation des MPs, il semblerait qu'il existe des différences notables entre les processus qui font suite à une activation de la cellule et ceux consécutifs à son apoptose (Azevedo et al., 2007; VanWijk et al., 2003) (figure 10).

Lors de l'activation de la cellule, l'augmentation de la concentration cytosolique de calcium entraîne l'activation des protéines kinases et l'inhibition des phosphatases des chaînes légères de la myosine,

ainsi que l'activation de la calpaïne qui dégrade la taline. Ces phénomènes conduisent à la dissociation du cytosquelette et à la libération des MPs.

Durant l'apoptose, les caspases activées, en particulier la caspase 3 (Sebbagh et al., 2001), clivent et activent les ROCK I (Rho-associated kinase I). Grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de ROCK I, le Y27632, Coleman et al. (2001) ont observé une diminution de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine ainsi qu'une baisse de la production de MPs. ROCK I permet donc de favoriser la contraction de la cellule *via* l'actine et la myosine, ce qui conduit au détachement du cytosquelette de la membrane et *in fine*, à la libération des MPs.

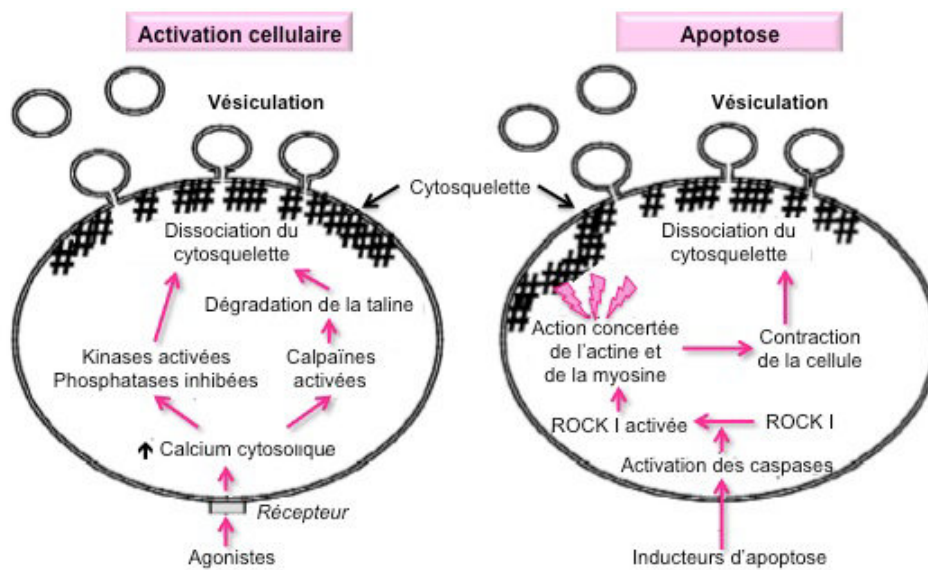


Figure 10 : Mécanismes de formation des MPs après activation cellulaire et apoptose (d'après VanWijk et al., 2003)

Concernant les cellules endothéliales, seules quelques études se sont intéressées aux différents stimuli et voies de signalisation impliqués dans la production des MPE (Markiewicz et al., 2013; Leroyer et al., 2010) :

- **Thrombine**

Sapet et al. (2006) ont identifié un mécanisme particulier de vésiculation induite par la thrombine : en se fixant sur les récepteurs endothéliaux PAR-1, la thrombine va d'une part activer la caspase 2 (sans pour autant induire de mort cellulaire) et cette dernière entraîne le clivage et donc l'activation des ROCK II ; d'autre part, la thrombine induit, *via* le facteur de transcription NF- κ B, l'expression de TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) ; la forme soluble (sTRAIL) est alors sécrétée par la

cellule endothéliale et stimule le récepteur TRAIL-R2, ce qui entraîne, de nouveau *via* NF- κ B, la libération des MPE (Simoncini et al., 2009).

Notons enfin que l'interleukine IL-1 et son récepteur (IL-1R) sembleraient contribuer à l'amplification de la production de MPE induite par la thrombine (Leroy et al., 2010).

- **Angiotensine II**

L'angiotensine II (Ang II) est également un bon inducteur de MPE à la fois *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Burger et al., 2011). L'activation des récepteurs AT₁R de l'Ang II augmente la libération de MPE *via* l'activation de la NADPH oxydase, la production de radicaux libres et l'activation des Rho kinases.

- **PAI-1**

Il a également été montré que PAI-1 joue un rôle important dans la production des MPE. Brodsky et al. (2002) ont démontré que PAI-1 augmente de manière dose-dépendante la libération de MPE et que cet effet est associé à une diminution de l'asymétrie des phospholipides membranaires.

- **TNF**

Une étude très récente réalisée chez la souris a mis en évidence une augmentation de la libération de MPE circulantes après administration par voie intraveineuse de TNF ; il a été montré *in vitro* que cet effet est lié à l'activation des récepteurs TNFR1 et dépend du facteur de transcription NF- κ B (Lee et al., 2014). L'étude de Curtis et collaborateurs a identifié *in vitro* un autre effecteur clé dans la formation des MPE induite par le TNF : **la protéine kinase p38** (p38 MAPK pour p38 mitogen-activated protein kinase) (Curtis et al., 2009).

Une équipe italienne a montré que la protéine p38 est également impliquée dans la production de MPs issues de cellules cérébrales. Cette équipe a mis en évidence que l'ATP active les récepteurs P2X₇ exprimés par les cellules gliales et en particulier par les astrocytes (Bianco et al., 2009) et la microglie (Bianco et al., 2005), ce qui conduit à la phosphorylation de la protéine kinase p38, qui active à son tour la translocation de l'acide sphingomyélinase (A-SMase) vers le feuillet externe de la membrane. L'A-SMase permet l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide, ce qui, en altérant la fluidité de la membrane, entraîne la libération des MPs (Bianco et al., 2009).

II. Caractéristiques des microparticules

1. Structure des microparticules

Les MPs sont des vésicules anucléées entourées d'une bicouche lipidique et sont considérées comme de vrais réservoirs moléculaires : elles contiennent en effet des acides nucléiques (ADN, ARN, microARN), des protéines (récepteurs, cytokines, intégrines) ainsi que des lipides et des mitochondries (Schindler et al., 2014) (figure 11).

La composition en phospholipides de la membrane des MPs varie selon la cellule d'origine. Néanmoins, il a été montré que le feuillet externe de toutes les MPs est enrichi en phospholipides négativement chargés, parmi lesquels se trouve la phosphatidylsérine (Weerheim et al., 2002).

A leur surface, hormis la phosphatidylsérine, les MPs expriment des antigènes caractéristiques de leur cellule d'origine. Concernant les MPE, elles portent des marqueurs endothéliaux tels que la VE-cadhérine (CD144), PECAM-1 (CD31), l'endogline (CD105), ICAM-1 (CD54), la E-sélectine (CD62E), l' α v intégrine (CD51) et VCAM-1 (CD106) notamment (Dignat-George et Boulanger, 2011). Les MPE expriment également des métalloprotéases de la matrice (MMP), en particulier les MMP-2 et MMP-9 (Taraboletti et al., 2002), la NO-synthase endothéliale et le récepteur R2 au VEGF (vascular endothelial growth factor) (Leroyer et al., 2009).

Par ailleurs, le phénotype des MPE dépend également du stimulus (activation ou apoptose) ayant conduit à leur formation. Jimenez et collaborateurs ont étudié *in vitro* le phénotype des MPE libérées par des cellules endothéliales en apoptose par déplétion du milieu de culture en facteurs de croissance, ou après activation cellulaire par le TNF. Après apoptose, le taux de MPE exprimant PECAM-1 (CD31) et l'endogline (CD105) est largement augmenté et supérieur au taux de MPE exprimant la E-sélectine (CD62E), ICAM-1 (CD54) et VCAM-1 (CD106). En revanche, après activation des cellules endothéliales par le TNF, cette répartition des phénotypes est totalement inversée (Jimenez et al., 2003).

De plus, il a été rapporté que la membrane des MPE produites par des cellules en apoptose présente une composition lipidique différente de celle des MPE issues de cellules activées, et comporte notamment une quantité de phosphatidylsérine transloquée plus importante (Markiewicz et al., 2013).

L'analyse du phénotype des MPE pourrait ainsi être un indicateur de la nature de la lésion endothéliale.

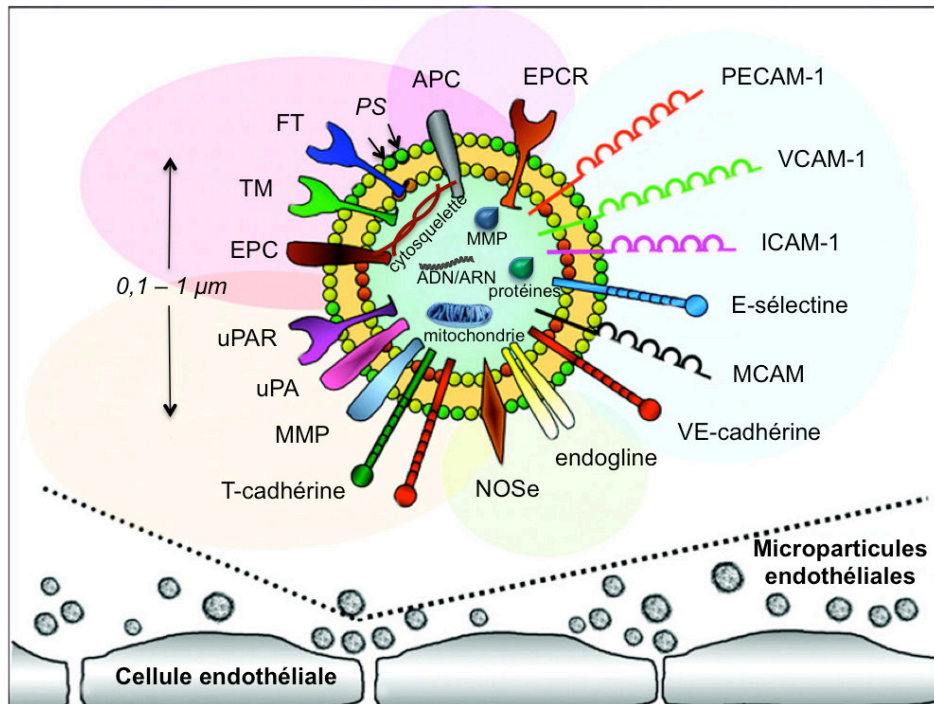


Figure 11 : Structure d'une MPE (adaptée d'après Dignat-George et Boulanger, 2011)

FT: facteur tissulaire ; PS: phosphatidylsérine; APC: protéine C activée ; EPCR: récepteur de la protéine C endothéliale ; PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule-1 ; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1 ; ICAM-1: intercellular cell adhesion molecule-1 ; E-sélectine: sélectine endothéliale ; MCAM : melanoma cell adhesion molecule ; VE-cadhérine : vascular endothelial cadherin; NOSe : NO synthase-endothéliale; T-cadhérine (« truncated-cadherin »): cadhérine-13 ; MMP : métalloprotéases de la matrice; uPA : urokinase-type plasminogen activator ; uPAR : récepteur de l'uPA ; EPC : protéine C endothéliale ; TM : thrombomoduline

2. Critères de distinction entre microparticules et autres vésicules membranaires

Les MPs sont à différencier des autres types de vésicules membranaires libérées par les cellules telles que les exosomes et les corps apoptotiques. Les caractéristiques propres aux trois types de vésicules extracellulaires sont résumées dans le tableau 1 (voir pour revues : Van der Pol et al., 2012; György et al., 2011).

- **Les exosomes** ont un diamètre inférieur à 0,1 µm et sont stockés à l'intérieur de la cellule dans des corps multi-vésiculaires. Les mécanismes de libération des exosomes dans le milieu extracellulaire diffèrent de ceux des MPs puisqu'ils sont sécrétés par exocytose. Ils possèdent des marqueurs spécifiques comme les tétraspanines et n'expriment pas ou très peu la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la double membrane. Ils contiennent également de l'ARN et des microARN.

- **Les corps apoptotiques** ont de manière générale une taille supérieure à celle des MPs (jusqu'à 4 μm) et sont caractérisés par une forte expression de la phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la bicouche lipidique. Par ailleurs, la bicouche lipidique est, contrairement à celle des MPs, une membrane perméable. Les corps apoptotiques sont libérés lors de l'apoptose après déformation et fragmentation de la cellule. Ils sont produits lors des dernières étapes de l'apoptose alors que les MPs sont libérées dès les phases précoces. Les corps apoptotiques contiennent des organites, de l'ADN, de l'ARN et des fragments membranaires et cytosoliques.

Tableau 1 : CARACTÉRISTIQUES DES VÉSICULES EXTRA-CELLULAIRES

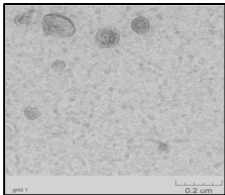
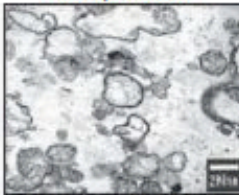
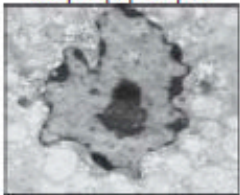
	Exosomes	Microparticules	Corps apoptotiques
			
Taille	0,04 – 0,1 μm	0,1 – 1 μm	0,5 – 4 μm
Origine	Exocytose des corps multi-vésiculaires	Bourgeonnement de la membrane plasmatique	Fragments cellulaires
Production	Constitutive et/ou activation cellulaire	Activation cellulaire et/ou apoptose précoce	Apoptose avancée
Méthode d'obtention (centrifugation)	> 100 000 g	20 000 g	16 000 g
Phosphatidylsérine externalisée	+/-	+++	+++
Marqueurs	Tétraspansines (CD63, CD81)	Antigènes de la cellule d'origine, intégrines, sélectines	Histones, ADN

Tableau adapté de Balducci et al., 2012 et de Mause et Weber, 2010

A partir des caractéristiques des MPs que nous venons de décrire, différentes techniques de détection ont été développées.

III. Méthodes d'analyse des microparticules

1. Recommandations pré-analytiques

L'intérêt grandissant pour les MPs depuis quelques années a conduit à mettre en place des recommandations actuellement en cours de réalisation, notamment dans le cadre des Comités scientifiques de standardisation de biologie vasculaire (SSC-VB) de la Société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH), afin de standardiser au mieux la détection de ces particules et en particulier des MPs circulantes lors des études cliniques (Balducci et al., 2012).

Une problématique majeure rencontrée lors de la mesure des MPs est la génération artéfactuelle de MPs, ce qui peut notamment survenir au moment du prélèvement de sang, puis entre le prélèvement et l'analyse des échantillons. Il est donc nécessaire de contrôler au maximum l'activation cellulaire *ex vivo/in vitro* par la standardisation de certaines étapes pré-analytiques comme le choix du mode de prélèvement, de l'anticoagulant et de la taille de l'aiguille, mais aussi le temps écoulé entre le prélèvement et la première centrifugation.

L'isolation des MPs nécessite une succession de centrifugations afin de limiter au maximum la contamination de l'échantillon par des cellules ou d'autres types de vésicules.

Plusieurs méthodes de détection des MPs ont été développées. Chacune présente des avantages et des inconvénients (tableau 2). Actuellement, la méthode la plus utilisée reste la cytométrie en flux.

2. Cytométrie en flux

Il s'agit d'une technique simple et spécifique qui permet une analyse quantitative rapide des MPs. Cette technique permet non seulement de définir le nombre de MPs contenues dans l'échantillon mais également de déterminer leur origine cellulaire.

L'échantillon est aspiré par l'appareillage et les « évènements » présents dans l'échantillon, tels que les cellules ou les MPs, sont détectés par les lasers du cytomètre.

Le cytomètre permet de définir tout d'abord une population « d'évènements de type microparticulaire » en fonction de leur taille (forward scatter ; FS) et de leur granulosité (side scatter ; SS). Dans cette zone, les MPs seront mesurées grâce à la détection de la phosphatidylsérine (révélée par un marquage à l'annexine V couplée à un fluorochrome), et/ou de marqueurs spécifiques de surface après fixation d'anticorps fluorescents.

Concernant les MPE, plusieurs marqueurs ou combinaison de marqueurs sont à présent utilisés en routine pour évaluer l'origine endothéliale des MPs : CD144 (VE-cadhérine), CD31+ (PECAM-1)/CD41- (intégrine α IIb), CD105 (endogline), CD106 (VCAM-1), CD146 (MCAM), CD62E (E-sélectine).

Les limites principales de la cytométrie en flux sont la faible résolution pour les éléments de très petite taille ($<0,4 \mu\text{m}$), et la difficulté de détecter des événements qui présentent une faible antigénicité.

3. ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) et test de capture en phase solide

Le principe de détection de ces deux techniques est fondé sur une interaction phosphatidylsérine-annexine V ou une interaction antigène-anticorps. Les MPs sont donc détectées en fonction de leur expression de la phosphatidylsérine et/ou de leur origine cellulaire. Il existe également des tests hybrides qui permettent de combiner un test de capture en phase solide à la mesure de l'activité prothrombinasique des MPs (voir paragraphe IV.3).

Ces techniques simples d'utilisation sont assez sensibles pour détecter des antigènes présents en faible quantité en surface des MPs. En revanche, ils ne donnent aucune information en ce qui concerne la taille des MPs et leur numération absolue. De plus, l'ELISA peut dans certains cas détecter non seulement des MPs mais aussi des antigènes solubles, ce qui conduit à la surestimation des taux de MPs.

4. Microscopie électronique à transmission / à force atomique

La microscopie électronique à transmission permet de visualiser les MPs. La haute résolution de cette technique permet d'évaluer leur taille et leur morphologie. Il est également possible de mettre en évidence la présence de certains marqueurs par immunochimie. Cette technique ne permet cependant pas de quantifier les particules dans un échantillon. La microscopie à force atomique apporte elle aussi de très bons renseignements quant à la taille et la morphologie de MPs. Elle permet de visualiser la topographie de la surface des MPs. Cette technique est dotée d'une très haute résolution (inférieure au nanomètre) assurant ainsi une analyse structurale très précise des MPs.

5. Tests fonctionnels

Comme décrit précédemment, les MPs expriment la phosphatidylsérine et le facteur tissulaire en surface, qui permettent tous les deux l'initiation de la cascade de coagulation (se référer au paragraphe IV.3). Par conséquent, les tests fonctionnels consistent à mesurer l'activité pro-coagulante des MPs en évaluant la génération de thrombine. En revanche, ces tests ne permettent pas d'évaluer l'origine cellulaire des MPs ni même leur nombre.

Tableau 2 : CARACTÉRISTIQUES DES MÉTHODES DE DÉTECTION DES MPs						
	Taille	Détection de la phosphatidyl-sérine	Activité procoagulante	Origine cellulaire	Quantification absolue	Disponibilité/simplicité
Cytométrie en flux	+	++	-	++	++	++
ELISA	-	-	-	+	-	++
Capture en phase solide	-	++	++	++	-	++
Microscopie électronique	++	-	-	-	-	+
Microscopie à force atomique	++	-	-	+	++	-

Tableau issu de la thèse du Dr Vion, 2012

L'ensemble de ces techniques a jusqu'à présent permis de détecter les MPs lors d'études cliniques et précliniques. Ces MPs se sont révélées être de véritables entités dotées de nombreuses propriétés biologiques. La description des rôles des MPs présentée ci-dessous porte principalement sur les MPs d'origine endothéliale qui ont été spécifiquement étudiées lors de mes travaux de thèse.

IV. Microparticules endothéliales (MPE) : marqueurs et acteurs

Il est tout d'abord important de préciser qu'il existe chez les individus sains un taux faible mais non négligeable de MPs circulantes qui contribuent à la régulation des fonctions de l'endothélium. En revanche, quand les cellules sont soumises à un stress, le nombre de MPE libérées est augmenté et leur composition est modifiée. Les MPs sont donc considérées comme de bons **marqueurs** d'activation cellulaire. Par ailleurs, de plus en plus d'études montrent que les MPE ne sont pas de simples témoins de la souffrance endothéliale mais également des **acteurs** grâce à l'expression, à leur surface, d'un ensemble d'effecteurs (MMP, uPA, facteur tissulaire, ICAM-1...) et grâce aux molécules bioactives qu'elles contiennent. Les MPs permettent ainsi une communication intercellulaire par la sécrétion de médiateurs solubles, par contact direct avec les récepteurs des cellules cibles, ou par fusion/internalisation avec la cellule cible (figure 12) (Budaj et al., 2012; Mause et Weber, 2010).

Il a été montré que le taux de MPs est augmenté au cours de différentes maladies, et en particulier lors de maladies cardiovasculaires (voir pour revue Viera et al., 2012). De nombreuses études ont mis en évidence l'importance des MPs d'origine endothéliale comme marqueurs plasmatiques de l'atteinte endothéliale au cours de ces maladies cardiovasculaires (Boulanger et al., 2008). Notons par exemple l'étude de Mallat et al. (2000) qui a montré qu'au cours d'un syndrome coronarien aigu,

les patients ont un taux de MPE circulantes plus élevé par rapport à des patients avec un angor stable ou à des sujets sains. Ainsi, le taux de MPE reflète le degré de la lésion vasculaire et inflammatoire. Par ailleurs, les MPs sont également des marqueurs de lésions endothéliales puisqu'elles sont retrouvées en très grande concentration dans les plaques d'athérosclérose. Ces plaques contiennent des MPs de différentes origines et majoritairement leucocytaires, ce qui reflète l'inflammation locale (Leroyer et al., 2007).

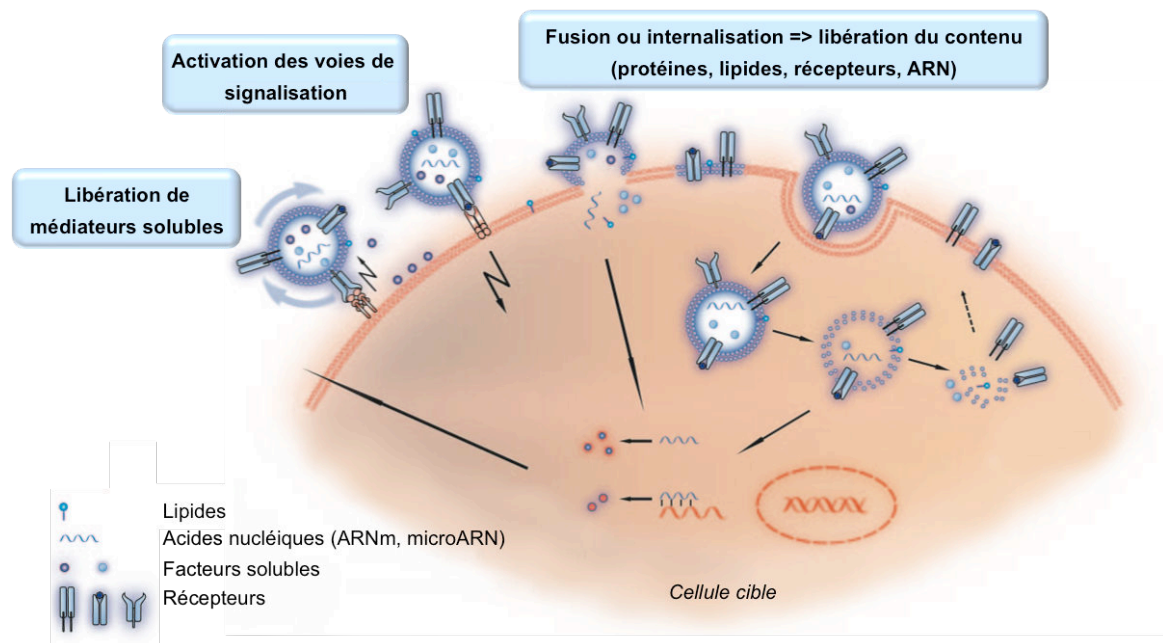


Figure 12 : Mécanismes empruntés par les MPs pour le transfert intercellulaire d'informations (d'après Mause et Weber, 2010)

En interagissant de manière transitoire ou stable avec la cellule cible, les MPs peuvent libérer des médiateurs solubles tels que IL-1 β . De plus, en se fixant sur des récepteurs membranaires, les MPs sont capables d'activer des voies de signalisation intracellulaires spécifiques. Les MPs peuvent également fusionner avec la cellule cible, ou encore être internalisées dans la cellule, ce qui entraîne la libération de leur contenu (lipides bioactifs tels que l'acide arachidonique, récepteurs, protéines, ARNm et microARN). Ces molécules peuvent alors activer la cellule et modifier l'expression de certains gènes, ou bien être recyclées et exprimées à la surface de la cellule cible.

Les MPs libérées par l'endothélium exercent un effet paracrine qui contribue à la dysfonction endothéliale. En effet, il est maintenant établi que les MPs jouent un rôle dans la vasoréactivité de l'endothélium, l'inflammation et l'hémostase (voir pour revue Lovren et Verma, 2013).

1. MPE et vasoréactivité

Il a été montré chez des patients insuffisants rénaux, coronariens, ou encore diabétiques que plus le taux de MPE est élevé, plus l'amplitude de la vasodilatation induite par le flux est faible, indépendamment de l'âge et de la pression artérielle ; cette corrélation n'existe pas pour les autres types de MPs telles que les MPs d'origine plaquettaire (Werner et al., 2006; Amabile et al., 2005; Koga et al., 2005). Ainsi, ces résultats suggèrent que plus le nombre de MPE circulantes est important, moins les artères seraient capables de s'adapter face à une augmentation du débit sanguin. D'autres études ont également souligné le lien existant entre MPE et rigidité artérielle (J.-M. Wang et al., 2007; Amabile et al., 2005).

Plusieurs équipes se sont intéressées aux effets des MPE sur les propriétés vasomotrices de l'endothélium, et ont montré le rôle clé du NO :

- Brodsky et al. ont isolé des MPE à partir de cellules endothéliales en culture et les ont mises en contact avec des aortes isolées de rats. Ils ont ainsi montré que les MPE perturbent la vasorelaxation endothélium-dépendante induite par l'acétylcholine *via* une diminution des taux de NO. Cette équipe a également montré que les MPE expriment la NADPH-oxydase et produisent des anions superoxyde ; de plus, elles augmentent la libération par les cellules endothéliales cibles d'anions superoxyde. Les anions superoxyde en découplant d'une part la NOS endothéliale, et d'autre part en s'associant avec le NO pour former des peroxy-nitrites, diminuent la biodisponibilité du NO et la vasoréactivité de l'endothélium (Brodsky et al., 2004). D'autres études ont depuis confirmé le rôle pro-oxydant des MPE (Burger et al., 2011; Mezentsev et al., 2005).
- D'autre part, il a été montré que les MPE provenant de sang de patients coronariens ou souffrant d'insuffisance rénale et mises en contact *in vitro* avec des aortes thoraciques isolées de rats, diminuent la production de NO ; et cet effet ne serait pas lié à une altération de l'expression de la NOS endothéliale (Amabile et al., 2005; Boulanger et al., 2001).

Ainsi, les MPE sont à l'origine d'une augmentation du stress oxydant et d'une diminution de la production de NO au sein des cellules endothéliales. La réduction du NO diminue les propriétés vasculoprotectrices et antiathérogènes de l'endothélium, et augmente la rigidité artérielle.

2. MPs et inflammation

Le rôle pro-inflammatoire des MPs a été particulièrement étudié avec les MPs d'origine plaquettaire. La stimulation de cellules endothéliales *in vitro* par des MPs plaquettaires augmente la libération de cytokines (IL-6, IL-8 et IL-1 β) et l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine) par les cellules endothéliales (Nomura et al., 2001). De plus, les MPs plaquettaires peuvent, lors de leur formation, piéger la forme inactive d'IL-1 β (pro IL-1 β) initialement contenue dans les plaquettes, et sont capables d'activer cette interleukine qui participe à l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium. Les MPs plaquettaires peuvent également libérer de l'acide arachidonique dans les cellules cibles endothéliales et augmenter l'expression de la COX-2 et la production de prostaglandine I₂ (PGI₂) (Barry et al., 1997).

Concernant les MPs d'origine endothéliale, ces dernières sont impliquées dans la maturation des cellules dendritiques (de type plasmacytoïde) et induisent la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) (Angelot et al., 2009).

Récemment, Curtis et collaborateurs (2009) ont confirmé *in vitro* l'effet pro-inflammatoire des MPE. En stimulant des cellules endothéliales humaines par du TNF, cette équipe a dans un premier temps augmenté la libération de MPE. Dans un second temps, ces MPE ont été isolées et ajoutées dans le milieu de culture de cellules endothéliales « naïves ». Après 16 heures d'incubation, les MPE ont multiplié par 4 la libération de la forme soluble d'ICAM-1 par les cellules endothéliales.

L'effet pro-inflammatoire des MPE induites par du TNF a été confirmé très récemment par Lee et al. (2014) qui ont montré une augmentation de l'expression de la forme non pas soluble mais membranaire d'ICAM-1 par des cellules endothéliales incubées avec ces MPE, ainsi qu'une augmentation de l'adhésion des monocytes.

De même, Burger et al. (2011) ont montré que des MPE induites préalablement par l'Ang II puis mises en contact avec des cellules endothéliales « naïves », augmentent l'expression endothéliale de VCAM-1 et de PECAM, ainsi que l'adhésion des macrophages.

3. MPE et hémostase

Il est désormais bien établi que les MPs possèdent une activité pro-coagulante (voir pour revue Lacroix et Dignat-George, 2012). En effet, la phosphatidylsérine présente sur le feuillet externe des MPs leur permet de fixer et d'assembler les facteurs de coagulation, ce qui conduit à la formation de thrombine. Il s'y forme notamment le complexe ténase (association des facteurs VIIIa et IXa permettant l'activation du facteur X) et/ou le complexe prothrombinase (association des facteurs

Va et Xa permettant l'activation de la prothrombine). L'activité pro-coagulante des MPs est également renforcée par l'expression en surface des MPs du facteur tissulaire (FT) qui, comme nous l'avons vu précédemment, initie la cascade de la coagulation.

Par ailleurs, grâce à l'expression de molécules d'adhésion telles que ICAM-1, les MPE sont capables de se lier à d'autres cellules comme les monocytes ; cette interaction est à l'origine d'une augmentation des taux de FT dans les monocytes, ce qui favorise leur pouvoir pro-coagulant (Sabatier et al., 2002).

Des études réalisées dans des modèles murins ont examiné le rôle des MPs dans la formation et le développement des thrombi. Pour cela, une lésion du lit artériel du muscle crémaster a été réalisée grâce à un laser et la formation des thrombi dans la microcirculation a été observée en temps réel par microscopie intravitale. Falati et al. (2003) ont montré que des MPs monocytaires fluorescentes injectées avant la lésion s'accumulent dans le thrombus en développement. L'accumulation de ces MPs dans le thrombus dépend de l'interaction entre la P-sélectine exprimée par les plaquettes et son ligand porté par les MPs (PSGL-1 pour P-sélectine glycoprotein ligand 1). Chou et al. (2004) ont ensuite montré que cette accumulation de MPs permet d'augmenter la quantité de FT au niveau du thrombus ce qui participe à la formation de fibrine et au renforcement du caillot.

Notons que les MPE participent également à l'agrégation plaquettaire. Jy et al. (2005) ont mis en évidence que les MPE portent en surface le facteur Von Willebrand et le facteur VIII qui favorisent l'agrégation plaquettaire. Il a été montré que les agrégats plaquettaires ainsi formés sont plus stables que ceux formés par le facteur Von Willebrand soluble (Jy et al., 2005).

Au niveau artériel, les plaques d'athérome renferment un grand nombre de MPs exprimant fortement le FT. Ces MPs sont l'acteur principal de la thrombogénicité de la plaque. Lors de la rupture de la plaque chez l'homme, les plaquettes et les facteurs de coagulation circulants rentrent en contact avec ces MPs, ce qui participe ainsi à la naissance du thrombus artériel (Balducci et al., 2012; Mallat et al., 2000). Au niveau veineux, les MPs qui expriment le FT participent à la formation de fibrine lors de la constitution du thrombus. Des études réalisées *in vivo* montrent que l'adhésion des MPs est précoce lors de la formation d'un thrombus veineux. Les MPs, en se fixant au fibrinogène, permettent de concentrer l'activité du FT au sein du thrombus (Balducci et al., 2012).

Cependant, il faut noter que des propriétés anticoagulantes ont également été attribuées aux MPE (Lacroix et Dignat-George, 2012). En effet, à la surface des MPE sont présents : le récepteur à la

protéine C activée, la thrombomoduline ou encore l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI). Ceci reflète la participation des MPE au maintien de l'équilibre hémostatique.

Néanmoins, en conditions pathologiques, les modifications de la nature et de la proportion des MPs circulantes conduisent souvent à une augmentation des capacités thrombotiques des MPs, ce qui explique l'intérêt de leur suivi dans des maladies mettant en jeu l'activation de l'hémostase.

Paradoxalement, une activité fibrinolytique des MPE a récemment été décrite à la fois *in vitro* et *in vivo* (Lacroix et Dignat-George, 2012). En effet, les MPs expriment le tPA, l'uPA et son récepteur uPAR ; elles présentent donc à leur surface un système catalytique permettant l'activation du plasminogène en plasmine, qui dégrade à son tour les caillots de fibrine (Lacroix et al., 2012). Les MPE sont également capables de s'associer au plasminogène lié à la fibrine. L'ensemble de ces données suggère un rôle des MPE dans la lyse du caillot *in vivo*.

4. MPE et angiogenèse

Il est important de noter qu'à côté de leur rôle dans la dysfonction endothéliale et de leurs effets délétères pro-inflammatoires et pro-thrombotiques, les MPs peuvent également exercer un rôle bénéfique en favorisant la réparation des tissus, par une action notamment sur la prolifération et la différenciation cellulaires et sur l'angiogenèse.

Des travaux ont mis en évidence une libération accrue de MPE pro-angiogéniques au niveau des zones ischémiées. Dans un modèle d'ischémie de la patte réalisé chez la souris, les MPs produites localement permettent d'augmenter la revascularisation post-ischémique par rapport aux souris naïves (Leroyer et al., 2009). Ces MPs, principalement d'origine endothéliale, sont capables d'entraîner la différenciation de progéniteurs endothéliaux en cellules endothéliales matures. D'autres études ont montré que les MPs peuvent, par transfert horizontal d'ARNm, activer les mécanismes d'angiogenèse des cellules endothéliales (Deregibus et al., 2007). L'effet pro-angiogénique des MPE s'explique également par la présence de facteurs protéolytiques à leur surface, comme la plasmine et les MMP (MMP-2 et MMP-9), qui dégradent la matrice extracellulaire et participent à la migration cellulaire.

Cependant, le rôle des MPE dans la réponse angiogénique reste controversé. Une étude a en particulier montré que les MPE, en augmentant le stress oxydant, diminuent la prolifération endothéliale et la formation de nouveaux vaisseaux *in vitro* (Mezentsev et al., 2005). De plus, Pirro et al. (2006) ont montré que les MPE circulantes de patients hypercholestérolémiques diminuent le nombre de progéniteurs endothéliaux, limitant par conséquent la capacité de réparation de l'endothélium. D'après Taraboletti et al. (2002) l'effet des MPE dépendrait en réalité de leur

concentration puisque l'ajout de faibles concentrations de MPE sur des cultures de cellules endothéliales entraîne un effet pro-angiogénique tandis qu'une forte quantité de MPE s'oppose à l'angiogénèse.

Au cours de ces dernières années, un certain nombre de propriétés biologiques ont été attribuées aux MPs ; les effets des MPs ont souvent été décrits comme délétères mais d'autres études soulignent leurs rôles bénéfiques. La question « les MPs, ennemies ou amies ? » se pose donc depuis plusieurs années et reste en suspens, en particulier *in vivo*.

V. Clairance des microparticules

Actuellement, les mécanismes cellulaires à l'origine de la clairance des MPs sont peu connus. Néanmoins, des études ont mis en évidence le rôle clé des **macrophages** qui sont capables d'entraîner l'élimination des MPs par phagocytose. La **β 2-glycoprotéine I** semble exercer un rôle clé dans la fixation des macrophages aux MPs puisqu'elle joue le rôle d'intermédiaire en se fixant à la phosphatidylsérine des MPs d'une part, et d'autre part, aux macrophages par son autre extrémité (Abdel-Monem et al., 2010). Dasgupta et al. (2009) ont montré que la **lactadhérine**, une glycoprotéine circulante, participe également à la clairance des MPs par les macrophages. La lactadhérine possède à son extrémité N-terminale un domaine « EGF-like » capable de se fixer aux macrophages. De plus, les deux domaines-C localisés sur l'extrémité N-terminale permettent de fixer la phosphatidylsérine des MPs. Ainsi, en faisant un lien entre les macrophages et les MPs, la lactadhérine favorise la phagocytose des MPs.

Par ailleurs, il a été montré que les **cellules endothéliales** participent à la clairance par endocytose des MPs, notamment lors de la fixation sur le récepteur endothélial de la phosphatidylsérine (**PSR**) de l'**annexine-I** des MPs (Jansen et al., 2012). De plus, une étude a mis en évidence le rôle de la protéine **Del-1** (« developmental endothelial locus-1 ») dans la clairance endothéliale des MPs. Del-1 est sécrétée par les cellules endothéliales et permet de lier des intégrines endothéliales aux phosphatidylsérines des MPs (Dasgupta et al., 2012).

Plusieurs études se sont intéressées à la vitesse de clairance des MPs dans l'organisme :

- Chez l'homme, Rank et al. (2011) ont analysé le sang de patients souffrant de thrombocytopenie après transfusion de plaquettes contenant un taux élevé de MPs plaquettaires. Immédiatement après la transfusion, le taux de MPs plaquettaires est

augmenté puis il diminue progressivement au fil des heures ; la demi-vie des MPs plaquettaires a ainsi été estimée à 5,8 heures.

- En revanche, des études réalisées dans des modèles animaux ont montré que la vitesse d'élimination des MPs est beaucoup plus rapide que celle observée chez l'homme par Rank et collaborateurs. En effet, moins de 10 minutes après l'injection de MPs plaquettaires chez le lapin (Rand et al., 2006), de MPs érythrocytaires chez le rat (Willekens et al., 2005) et de MPE chez la souris (Al Faraj et al., 2012), 80% des MPs sont éliminées de la circulation. De telles différences entre l'homme et l'animal peuvent avoir plusieurs explications. D'une part, les MPs injectées aux animaux ont été générées *in vitro* à partir de cellules activées ; or, le phénotype des MPs dépend du stimulus ayant conduit à leur production, les MPs injectées aux animaux pourraient donc présenter des marqueurs supplémentaires qui ont facilité leur clairance. D'autre part, l'étude chez l'homme a été réalisée chez des patients ayant un taux faible de leucocytes car en période d'aplasie médullaire. Or, il a été établi que la clairance des MPs est dépendante des monocytes/macrophages, ce qui pourrait expliquer le ralentissement de leur clairance (Abdel-Monem et al., 2010; Dasgupta et al., 2009).

Enfin, Willekens et al. (2005) ont montré *in vivo* chez le rat que l'élimination des MPs les conduit principalement dans le foie (45%), les os (23%), la peau (10%), mais également dans les muscles (6%), la rate (3%), les reins (3%) et enfin les poumons (2%).

VI. Microparticules et AVC

1. Microparticules au sein du système nerveux central (SNC)

Très peu de données concernant les MPs produites au niveau du SNC sont disponibles. Cette thématique récente représente un axe de recherche novateur et très prometteur, nécessaire pour accroître la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie du SNC.

Il est désormais établi que quasiment tous les types cellulaires retrouvés au niveau cérébral peuvent produire des MPs, comme les cellules endothéliales cérébrales, les neurones, les cellules gliales telles que la microglie, les astrocytes et les oligodendrocytes (Bianco et al., 2009; Schiera et al., 2007; Bianco et al., 2005; Scolding et al., 1989).

Les MPs sembleraient exercer un rôle physiologique au sein du SNC (Lai et Breakefield, 2012). En effet, les MPs participeraient au développement neuronal, à l'activité synaptique en favorisant notamment la libération de neurotransmetteurs et la transmission excitatrice. Enfin, les MPs joueraient un rôle protecteur dans la régénération neuronale après une lésion du système nerveux. Les MPs peuvent libérer des ARNm au sein des neurones lésés afin de favoriser leur prolifération et la synthèse protéique (figure 13).

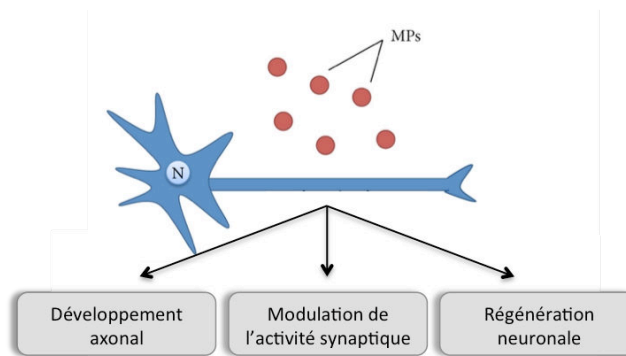


Figure 13 : Les effets bénéfiques des MPs sur les neurones (d'après Schindler et al., 2014)

Au cours de différentes maladies telles que les AVC, les traumatismes crâniens, les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) et tumorales (glioblastome), le taux de MPs est augmenté au niveau plasmatique mais également dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients (voir pour revues Schindler et al., 2014; Colombo et al., 2012; Lai et Breakefield, 2012).

Notons que la plupart des études se sont intéressées à l'augmentation des taux de MPs d'origine plaquettaire et endothéliale ; concernant les autres types de MPs, peu d'informations existent à ce jour. De plus, concernant les effets délétères des MPs dans le SNC, très peu de données sont actuellement disponibles (Turola et al., 2012; Horstman et al., 2007; Bianco et al., 2005). Quelques études ont notamment souligné l'effet pro-inflammatoire des MPs issues des cellules microgliales, en particulier dans un modèle murin de sclérose en plaque (Verderio et al., 2012; Bianco et al., 2009, 2005).

D'après les différents rôles des MPs décrits dans le paragraphe IV, les MPs pourraient donc participer et aggraver les mécanismes impliqués dans la physiopathologie des maladies neurologiques, et en particulier des AVC ischémiques (inflammation, diminution du tonus vasculaire, hypoperfusion cérébrale, occlusion de microvaisseaux ...).

Le sujet de recherche de cette thèse portant sur l'ischémie cérébrale, nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés aux MPs libérées lors d'un AVC.

2. Microparticules et AVC : les études cliniques

Seules quelques études cliniques se sont intéressées à la détection des MPs après un AVC. Le tableau 3 présente un résumé de ces études réalisées chez des patients souffrants d'AVC soit ischémiques, soit hémorragiques (hémorragies intra-parenchymateuses ou sous-arachnoïdiennes).

Tableau 3 : MICROPARTICULES ET AVC

Maladie	Origine cellulaire des MPs	Milieu biologique	Moment du Prélèvement (↔ délai après antécédents ou symptômes)	Observations	Références
Antécédents d'AVC ischémique	Endothéliale	sang	Antécédents ≥ 3 mois	↑ CD62E ⁺	Lee et al., 2012
Antécédents d'AVC ischémique	Plaquettaire	sang	Antécédents ≥ 3 mois	↑ CD61 ↑ CD62P	Lukasik et al., 2010
AVC ischémique	Plaquettaire	sang	Au moment de l'admission	↑ CD42 ⁺	Kuriyama et al., 2010
AVC ischémique	Endothéliale	sang	Médiane = 2,8 jours (≤ 72 h – 6 jours)	↑ CD62E ⁺	Jung et al., 2009
Phase chronique d'AVC ischémique	Plaquettaire	sang	> 3 mois	↑ CD42a ⁺	Shirafuji et al., 2008
AVC ischémique	Endothéliale	sang	< 24 h	↑ CD31 ⁺	Williams et al., 2007
AVC ischémique	Endothéliale	sang	Médiane = 37h (18,5 h – 51,8 h)	↑ CD105 ⁺ CD41a ⁻ CD45 ⁻ ↑ CD105 ⁺ CD144 ⁺ ↑ CD105 ⁺ PS ⁺ CD41a ⁻ ↑ CD105 ⁺ CD54 ⁺ CD45 ⁻	Simak et al., 2006
AVC ischémique	Plaquettaire	sang	≤ 7 jours puis entre 3 et 6 mois	↑ CD61 ⁺	Cherian et al., 2003
AVC ischémique	Plaquettaire	sang	< 10 jours	↑ CD42 ⁺	Lee et al., 1993
AVC hémorragique (intra-parenchymateux)	MPs totales	sang	De l'admission jusqu'au 7 ^{ème} jour	↑ Annexine V ⁺	Dong et al., 2011
AVC hémorragique (intra-parenchymateux)	MPs totales	sang, LCR	Lors de l'admission (sang) et de la chirurgie (sang et LCR) ↔ < 12 h	↑ Annexine V ⁺	Huang et al., 2009
AVC hémorragique (sous-arachnoïdien)	Endothéliale Plaquettaire	sang	Du 1 ^{er} jour au 15 ^{ème} jour	↑ CD105 ⁺ PS ⁺ ↑ CD62E ⁺ ↑ CD106 ⁺ ↑ CD41 ⁺	Lackner et al., 2010

CD62E : E-sélectine ; CD61 : GPIIIa ; CD62P : P-sélectine ; CD42 : GPIIb ; CD42a : GPIX ; CD31 : PECAM-1 ; CD105 : endogline ; CD41a : GPIIb ; CD45 : leukocyte common antigen ou LCA ; CD144 : VE-cadhérine ; CD54 : ICAM-1 ; CD106 : VCAM-1

Des résultats concordants montrent une augmentation de la libération des MPs d'origine endothéliale et plaquettaire dans le sang ou le LCR après un AVC ischémique ou hémorragique (tableau 3). Par ailleurs, une étude a montré que la libération de MPE après un AVC ischémique est due, non pas à des cellules en apoptose/nécrose, mais à des cellules endothéliales activées (Williams et al., 2007).

Concernant la cinétique de libération des MPs après un AVC ischémique, Cherian et al. (2003) ont détecté des taux élevés de MPs plaquettaires 7 jours après le début des symptômes et ont observé que ces taux persistent pendant 6 mois. Selon Jung et al. (2009), il existe une corrélation entre le taux de MPE et le délai qui s'est écoulé après les symptômes. Cette étude met en évidence une augmentation très importante des MPE le premier jour, puis le nombre chute progressivement jusqu'au 6^{ème} jour. Dans une autre étude réalisée chez des patients atteints d'AVC hémorragique de type intra-parenchymateux, le taux de MPs plasmatiques augmente dès 6h, atteint un pic à 24h puis diminue progressivement jusqu'au 7^{ème} jour après l'hémorragie (Dong et al., 2011). A plus long terme, il a été montré que des patients ayant un antécédent d'AVC ischémique datant d'au moins 3 mois possèdent des taux de MPs plaquettaires toujours significativement plus élevés que les patients témoins (Lukasik et al., 2010).

En 1993, la toute première étude à avoir montré une augmentation des MPs après un AVC ischémique avait également mis en évidence que le taux de MPs plaquettaires dépendait du type d'ischémie : les ischémies touchant les petits vaisseaux entraînaient une augmentation significativement plus importante des MPs plaquettaires que les ischémies affectant les gros vaisseaux (Lee et al., 1993). En revanche, plus récemment, ce résultat a été contredit par des études ne montrant aucune corrélation entre le taux de MPs plaquettaires (Cherian et al., 2003) et endothéliales (Jung et al., 2009) et l'étiologie de l'ischémie cérébrale (occlusion des petites artères, occlusion des grosses artères ou cardioembolie).

Par ailleurs, plusieurs études cliniques ont pu mettre en évidence des corrélations particulièrement intéressantes détaillées ci-dessous :

- Il existe une corrélation entre la sévérité de l'ischémie cérébrale évaluée par le score neurologique NIHSS (National Institutes of Health Stroke Score) et le taux de MPE (Jung et al., 2009; Simak et al., 2006) ; par ailleurs, plus les volumes des lésions cérébrales qui font suite à l'ischémie sont importants, plus le nombre de MPE retrouvées dans le sang est élevé (Jung et al., 2009; Simak et al., 2006).
- Plusieurs études ont montré que des taux faibles de MPE sont de bon pronostic chez les patients atteints d'AVC ischémiques car significativement associés à une amélioration clinique à la sortie de l'hôpital. Cette amélioration a été évaluée par deux scores

neurologiques : l'index de Barthel et le score de Rankin (Simak et al., 2006). Par ailleurs, une autre étude a suivi pendant 36 mois des patients ayant des antécédents d'AVC ischémiques datant d'au moins 3 mois au moment de l'inclusion. Chez ces patients, plus le taux de MPE est élevé au moment de l'inclusion, plus le risque de survenue d'un événement cardiovasculaire ou d'une hospitalisation est important dans les mois qui suivent (Lee et al., 2012).

- Les patients présentant des facteurs de risque cardiovasculaires, *i.e.* des sujets à risque potentiel d'AVC, ont des taux de MPE significativement élevés (Jung et al., 2009).

Notons que ces corrélations mettent en jeu des phénotypes de MPE différents selon les études et qui n'ont pas été détaillés ici pour des raisons de clarté.

L'ensemble des données cliniques décrites ci-dessus souligne le potentiel majeur des MPs qui semblent réunir les qualités requises pour être de bons biomarqueurs des AVC (Balducci et al., 2012; Anglés-Cano et al., 2009) :

- La valeur prédictive des MPs permettrait de définir et de suivre les patients à haut risque cardiovasculaire. La détection des MPs serait un signal d'alerte de la survenue d'accidents ischémiques.
- Chez les patients dont le diagnostic d'AVC est établi, les MPs permettraient de stratifier les malades selon leur gravité afin d'assurer une prise en charge « personnalisée ».
- Par ailleurs, les MPs semblent être de bons marqueurs pronostiques après AVC car leur détection a permis de stratifier les patients à risque de complications cardiovasculaires post-AVC.
- Les MPs libérées dans le compartiment vasculaire sont le reflet d'une activation/apoptose de tissus parfois difficiles d'accès. De plus, les cellules en souffrance qui émettent ces MPs sont généralement rapidement phagocytées ou séquestrées dans des zones inaccessibles, ce qui rend leur dosage souvent difficile. Le dosage des MPs circulantes facilement détectables pourrait donc être une alternative intéressante.
- A l'inverse des biomarqueurs classiquement rencontrés (protéine C-réactive, TNF, IL-6, D-dimères, fibrinogène..) qui sont le reflet d'un état inflammatoire ou de modifications de l'hémostase, les MPs seraient spécifiques de la lésion cérébrovasculaire car elles sont spécifiques de la cellule stimulée ou lésée.
- Enfin, certains travaux ont même montré le potentiel des MPs comme marqueur d'efficacité des traitements pharmacologiques.

En effet, de plus en plus d'études cliniques ont montré qu'il est possible de moduler pharmacologiquement les taux de MPs. Des antioxydants comme la vitamine C diminuent le taux de MPE notamment chez des patients diabétiques après un infarctus du myocarde. Plusieurs autres médicaments tels que des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II, des antagonistes calciques, l'aspirine ou encore le clopidogrel, ont entraîné une diminution des taux de MPs circulantes lors de maladies cardiovasculaires. En revanche, l'effet des statines reste très controversé car dans certaines études, les statines induisent une augmentation de la libération de MPs et dans d'autres, une diminution. La digoxine a quant à elle entraîné une augmentation des taux de MPs d'origine endothéliale et plaquettaire (voir pour revues Schiro et al., 2014; Roseblade et al., 2013). Néanmoins, il n'est pas encore établi si la baisse des MPs observée après un traitement est due au traitement lui-même ou bien à une diminution de l'environnement inflammatoire par exemple ou même à un meilleur contrôle des facteurs de risques et donc une amélioration de l'état des cellules par exemple. De plus, il reste encore à évaluer si la réduction du taux de MPs participe à l'efficacité thérapeutique du traitement.

TROISIÈME CHAPITRE : LA THROMBOLYSE PAR LE RT-PA LORS D'UN AVCi

Actuellement, le seul traitement pharmacologique dont disposent les neurologues pour la prise en charge de la phase aiguë d'un AVCi est l'administration de l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (**rt-PA**) ou altéplase (Actilyse®). Il s'agit d'un traitement thrombolytique dont le rôle est de lyser le caillot à l'origine de l'ischémie cérébrale afin de reperfusionner le tissu cérébral (voir pour revue Acheampong et Ford, 2012). Le rt-PA, obtenu par recombinaison génétique, a été développé afin de mimer la protéine endogène, le t-PA.

I. Structure et mécanisme d'action du t-PA

Le t-PA endogène est une glycoprotéine stockée dans les corps de Weibel Palade des cellules endothéliales, mais également dans des petites granules de stockage contenues dans les cellules endothéliales et les neurones, et de manière plus controversée, dans les cellules gliales (Kruithof et Dunoyer-Geindre, 2014).

Le t-PA synthétisé dans la cellule est libéré dans le milieu extracellulaire sous forme de sctPA (« single chain t-PA ») car composé d'une seule chaîne polypeptidique de 69 kDa (527 acides aminés). Le sctPA contient 5 domaines comme l'illustre la Figure 14 (Vivien et al., 2011) : le domaine « Finger » et le domaine Kringle 2 sont impliqués dans la liaison du t-PA à la fibrine ; le domaine « EGF » (epidermal growth factor) stabilise le site catalytique du t-PA et est impliqué, avec le domaine « Finger », dans la clairance hépatique du t-PA (Bu et al., 1994) ; enfin, le domaine protéasique contient le site actif. Une fois libéré dans le milieu extracellulaire, le sctPA est clivé par la plasmine en tctPA (« two-chain t-PA ») constitué de deux chaînes reliées par un pont disulfure : la chaîne lourde contient le domaine « Finger », le domaine « EGF » et les deux domaines Kringle, et la chaîne légère contient le domaine protéasique (Vivien et al., 2011).

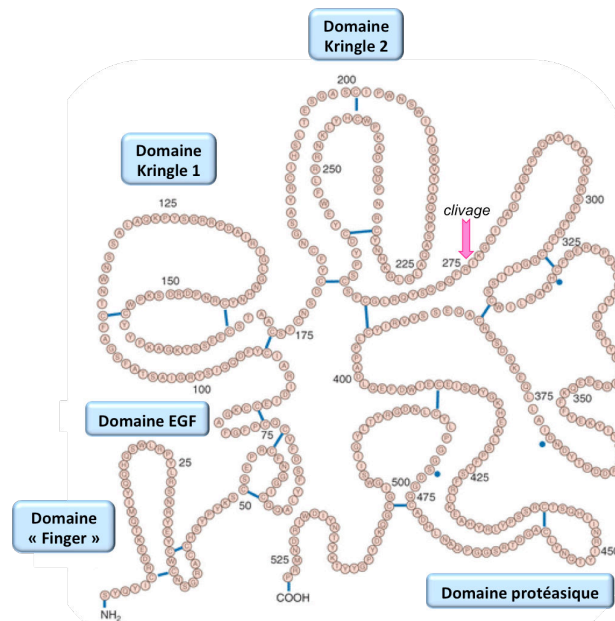


Figure 14 : Structure du t-PA (d'après Acheampong et Ford, 2012)

La flèche indique le site de clivage permettant la conversion du sctPA (simple chaîne) en tctPA (double chaîne).

Notons que le t-PA libéré en conditions physiologiques participe à diverses fonctions telles que la plasticité synaptique, la migration neuronale et l'angiogenèse (voir pour revue Kruihof et Dunoyer-Geindre, 2014) mais son rôle principal concerne son implication dans la fibrinolyse. En effet, le t-PA est une sérine protéase qui clive le plasminogène et le transforme en plasmine (figure 15). La plasmine est une protéase capable de s'attaquer aux polymères de fibrine insolubles. Ainsi, elle clive la fibrine à différents niveaux de sa structure ce qui conduit à la lyse du thrombus, et libère des fragments de dégradation solubles comme les domaines E et D, les D-dimères, et des fragments de la chaîne α .

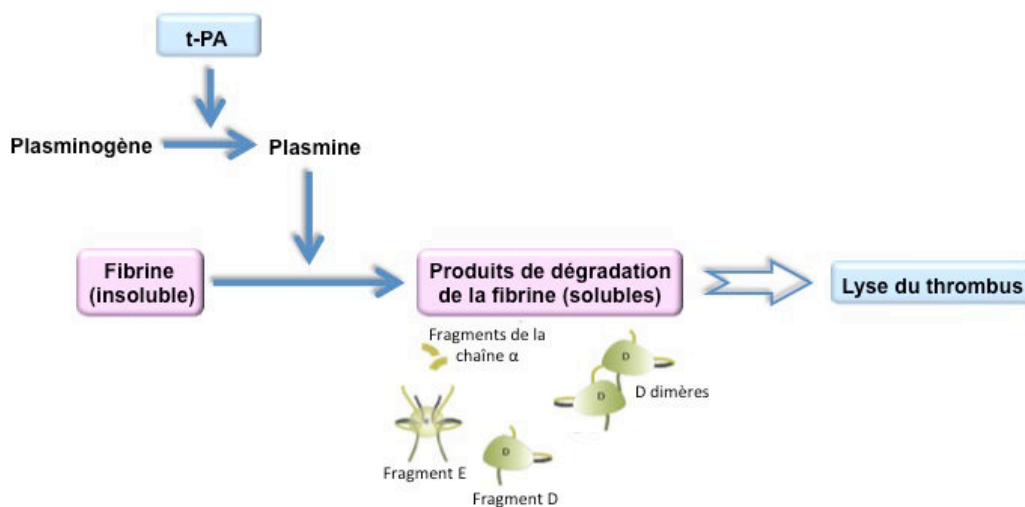


Figure 15 : Étapes de la fibrinolyse initiée par le t-PA

Le t-PA possède une forte affinité pour la fibrine et son activité est essentiellement fibrine-dépendante. En effet, le t-PA active préférentiellement le plasminogène fixé à la fibrine (Wechsler, 2011). Dans le compartiment vasculaire, la fibrine active de manière similaire les deux formes de t-PA (sctPA et tctPA). Il est également important de noter que le sctPA et le tctPA présentent une efficacité équivalente pour la fibrinolyse (Parcq et al., 2012).

Le principal inhibiteur du t-PA est PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1). Au niveau cérébral, le t-PA peut également être inhibé par la neuroserpine (Kruithof et Dunoyer-Geindre, 2014).

Chez l'homme, la demi-vie du t-PA après administration par voie intraveineuse est inférieure à 5 minutes mais son activité thrombolytique peut durer plus longtemps grâce à sa fixation sur la fibrine (Wechsler, 2011). La clairance du t-PA est principalement réalisée par le foie par endocytose *via* notamment les récepteurs LRP-1 (low-density lipoprotein receptor-related protein) (Bu et al., 1994).

Lors de situations pathologiques comme l'ischémie cérébrale, les taux de t-PA endogène sont augmentés grâce à différents stimuli comme la thrombine ou des médiateurs pro-inflammatoires (TNF, IL-1). Cette augmentation peut parfois être suffisante pour lyser le thrombus, ce qui expliquerait pourquoi environ 17% des patients victimes d'AVCi ont une recanalisation spontanée dans les 6 à 8 heures après le début de l'épisode ischémique (Kassem-Moussa et Graffagnino, 2002). Néanmoins, dans la majorité des cas, la fibrinolyse endogène ne suffit pas et les cliniciens ont recours à l'administration du rt-PA (Actilyse®).

II. Le rt-PA en clinique

Les premières études cliniques qui ont examiné l'intérêt de l'administration intraveineuse du rt-PA lors de l'ischémie cérébrale remontent à 1995 (National Institute Of Neurological Disorders and Stroke ; NINDS). La thrombolyse par le rt-PA a été approuvée aux Etats-Unis en juin 1996, et ce n'est que 6 ans après que l'AMM pour les pays européens est obtenue.

Plusieurs essais cliniques ont montré que l'efficacité de ce thrombolytique dépend notamment de son délai d'administration : plus le rt-PA est administré rapidement après l'apparition des signes cliniques, meilleurs seront la récupération fonctionnelle et le pronostic vital. Tout d'abord limitée à 3 heures, la fenêtre thérapeutique a été élargie dans certains pays à 4,5 heures suite aux résultats de l'essai clinique ECASS III (European Cooperative Acute Stroke Study III). Cependant, le nombre réduit de patients bénéficiant du rt-PA reste toujours alarmant. Ainsi, en France, moins de 2% des AVCi sont

thrombolysés (Mahagne, 2008). Une des raisons est d'une part le temps nécessaire à la prise en charge des patients et à l'établissement du diagnostic d'AVCi. Le « *Door To Needle Time (DTNT)* » permet d'évaluer la durée entre l'arrivée à l'hôpital et l'injection du rt-PA. Selon les recommandations américaines, le « DTNT » doit être inférieur à 60 minutes, mais ce n'est malheureusement que rarement le cas. D'autre part, les contre-indications du rt-PA sont multiples (voir l'annexe page 201), ce qui explique pourquoi un grand nombre de patients ne sont pas éligibles à la thrombolyse. Parmi les critères d'éligibilité, la taille de la zone de pénombre est un critère essentiel car la restauration du débit sanguin ne sera bénéfique que si l'étendue de la zone de tissu encore viable est suffisamment importante.

Malgré le rôle essentiel du rt-PA dans la prise en charge des AVCi, ce traitement n'est pas dénué d'inconvénients. En effet, le rt-PA n'est pas efficace chez tous les patients et il présente une toxicité vasculaire (risque hémorragique) ainsi qu'une toxicité neuronale.

III. Le rt-PA, un thrombolytique pas toujours efficace !

1. Recanalisation sous rt-PA

a) Données cliniques

Un des problèmes majeurs rencontré par les cliniciens concerne l'efficacité du traitement par le rt-PA qui est loin d'être totale. La qualité de la recanalisation artérielle est évaluée en clinique par doppler transcrânien ou angiographie cérébrale. Plus de 70% des patients ne sont pas de bons répondeurs au rt-PA, malgré une prise en charge rapide et des signes cliniques de bon pronostic (zone de pénombre étendue) (Kaur et al., 2004). En effet, il a été montré que seuls 22 à 30% des patients traités par le rt-PA présentent une recanalisation complète ; pour 23 à 48% des patients, la recanalisation n'est que partielle ; et enfin, chez 22 à 41% des patients, aucune recanalisation n'est observée (tableau 4 ; Saqur et al., 2007a; Rubiera et al., 2005; Alexandrov et Grotta, 2002; Christou et al., 2000). Ceci pourrait donc expliquer pourquoi après une ischémie cérébrale, plus de 50% des patients thrombolysés ne présentent pas de récupération fonctionnelle complète, ou une récupération qui n'est que partielle (Wechsler, 2011).

Tableau 4 : RECANALISATION APRES THROMBOLYSE			
Références	RECANALISATION		
	Complète	Partielle	Absente
Christou et al., 2000	30%	40%	30%
Alexandrov et Grotta, 2002	30%	48%	22%
Rubiera et al., 2005	22%	37%	41%
Saqqur et al., 2007a	27%	23%	37%

Un paramètre prédictif de l'efficacité du rt-PA est le temps entre l'administration du rt-PA et la recanalisation. On distingue ainsi les recanalisation précoces (0 - 60 minutes), retardées (60 - 120 minutes) et tardives (120 minutes - 6 heures) (Ribo et al., 2006). La recanalisation induite par le rt-PA survient majoritairement pendant la 1^{ère} heure qui suit le début du traitement (Ribo et al., 2006; Alexandrov et al., 2001; Christou et al., 2000). Si la recanalisation n'a pas eu lieu dans l'heure, alors les chances qu'elle survienne dans les heures qui suivent sont diminuées (Ribo et al., 2006). Les raisons expliquant la réduction dramatique des taux de recanalisation après 1h seraient liées d'une part à la clairance très rapide du rt-PA (15 minutes après l'injection, il ne reste que 1% du rt-PA dans la circulation), et d'autre part à la composition du caillot qui évolue dans le temps.

Néanmoins, notons que même si la recanalisation arrive plus tardivement chez certains patients (*i.e.* dans les 6h après l'apparition des symptômes), elle pourra être malgré tout liée à une amélioration clinique (Ribo et al., 2006).

Un autre paramètre influençant l'efficacité du traitement est la vitesse de lyse du caillot qui peut être qualifiée de soudaine (< 1 minute), graduelle (1 – 29 minutes) ou lente (≥ 30 minutes). Alexandrov et collaborateurs se sont intéressés à ce paramètre chez des patients présentant une recanalisation complète ou partielle après rt-PA. Plus la vitesse de lyse du caillot est rapide, plus la recanalisation est efficace et complète, et meilleure est l'amélioration fonctionnelle (Alexandrov et al., 2001).

b) Mécanismes

Des données cliniques montrent que l'efficacité du rt-PA dépend notamment de la composition du caillot et de sa localisation dans le réseau artériel. Les caillots à l'origine d'une ischémie cérébrale sont constitués d'un réseau de fibrine et d'agrégats de plaquettes qui peuvent piéger des globules rouges et des leucocytes (Marder et al., 2006). La proportion de chacun de ces constituants varie selon l'origine du caillot et la maturation du caillot dans le temps.

➤ **Origine et composition du caillot**

Des études cliniques ont constaté que le profil de recanalisation après rt-PA dépend de l'étiologie de l'AVCi et donc de l'origine du caillot (Millán et al., 2010; Molina et al., 2004). En effet, d'une part les AVCi d'origine cardioembolique présentent des recanalisations précoces plus fréquentes, plus rapides et plus complètes par rapport aux autres types d'AVCi. D'autre part, il a été rapporté que les caillots de bon pronostic dont la vitesse de lyse est qualifiée de « soudaine », sont dans 80% des cas des embolies d'origine cardiaque (Molina et al., 2004). Ainsi, l'évaluation de l'origine du caillot serait un marqueur prédictif de l'efficacité de la thrombolyse en clinique.

Les embolies d'origine cardiaque seraient riches en fibrine et le rt-PA, qui a une forte affinité pour la fibrine, pourrait donc pénétrer facilement dans ce type de caillot et s'y répartir uniformément. Ceci conduirait donc à la lyse précoce et rapide de l'embolie. En revanche, lors d'AVCi thrombotiques, les thrombi seraient plus riches en plaquettes, la pénétration et la distribution du rt-PA dans ces caillots seraient donc limitées, ce qui entraînerait une lyse moins rapide et souvent incomplète (Molina et al., 2004).

Néanmoins, une étude clinique menée par Marder et al. (2006) a pour la première fois contredit cette hypothèse. En effet, l'étude histologique de thromboembolies issues de 25 patients ischémiés montre que la composition des caillots de patients souffrant d'AVCi cardioemboliques est similaire à celle des thrombi retrouvés dans les autres types d'AVCi. Ces caillots sont constitués à la fois de fibrine mais également de plaquettes, et contiennent des cellules nucléées et des érythrocytes.

➤ **Maturation et composition du caillot**

En clinique, il a été rapporté que les caillots « frais », c'est-à-dire qui viennent de se former, sont plus sensibles au rt-PA que les caillots plus « matures » (Molina et al., 2004). En effet, les caillots néoformés sont riches en fibrine et en globules rouges, et donc sensibles à l'action du rt-PA. En revanche, la thrombolyse est moins efficace sur les caillots plus « matures » car d'une part, le réseau de fibrine se consolide au fur et à mesure de la maturation du caillot, et d'autre part, au cours du temps, des plaquettes activées viennent s'agréger sur le caillot existant (Zhang et al., 2001). Ainsi, au cours de sa maturation, le caillot va s'enrichir en plaquettes jusqu'à contenir plus de plaquettes que de fibrine. De plus, ces plaquettes libèrent d'une part des inhibiteurs de la fibrinolyse tels que PAI-1 (inhibiteur du t-PA) et l' α 2-antiplasmine (inhibiteur de la plasmine), et d'autre part, le facteur XIII qui participe à la formation de fibrine. Cette accumulation des plaquettes rend ainsi le caillot plus résistant à la thrombolyse.

➤ Localisation du caillot

En clinique, il a été montré que l'efficacité du rt-PA dépend également de la localisation de l'occlusion à l'origine de l'ischémie. En effet, le rt-PA est moins efficace chez les patients qui présentent une occlusion des grosses artères cérébrales proximales telles que l'ACM proximale, l'artère carotide interne et l'artère basilaire : les taux de recanalisation chez ces patients sont faibles puisqu'ils sont compris entre 10 et 22% (Elijovich et Chong, 2010). Saqqur et collaborateurs ont montré que 2 heures après l'injection de rt-PA, les patients présentant une occlusion distale de l'ACM ont le taux de recanalisation complète le plus élevé (44,2%). En revanche, dès que l'occlusion est plus proximale, le taux de recanalisation complète chute : il est de 30% lorsque l'ACM proximale est occluse, et seulement de 5,9% lorsqu'il s'agit de l'artère carotide interne terminale (Saqqur et al., 2007b).

Ce taux de recanalisation extrêmement faible pour l'artère carotide interne terminale pourrait s'expliquer par l'existence de thrombus de taille plus importante et par une plus faible présence de collatérales (Saqqur et al., 2007b).

Comme nous venons de le voir, le rt-PA n'est efficace que chez un faible nombre de patients en terme de recanalisation. De plus, les patients pour lesquels le rt-PA a permis la recanalisation de l'artère peuvent présenter une reperfusion incomplète.

2. Hypoperfusion / réocclusion sous rt-PA

A la suite d'une recanalisation spontanée (sans rt-PA), des phénomènes de réocclusion peuvent survenir et être à l'origine d'une détérioration clinique des patients (Alexandrov et Grotta, 2002). Ce risque de réocclusion existe aussi après une thrombolyse par le rt-PA.

a) Données cliniques

Comme nous l'avons vu plus haut, des études ont montré que lors de l'administration du rt-PA, plus la recanalisation est précoce, meilleure est l'amélioration clinique. Cependant, De Silva et al. (2009) ont précisé que l'effet bénéfique de la recanalisation induite par le rt-PA en clinique est attribuable non pas à la recanalisation elle-même, mais à la qualité de la reperfusion ; la reperfusion du tissu est plus prédictive de l'amélioration clinique à la suite de la thrombolyse que la recanalisation (Luby et al., 2014; Soares et al., 2010; De Silva et al., 2009).

Néanmoins, malgré une recanalisation efficace en clinique, le rt-PA peut parfois entraîner une reperfusion insuffisante voire inexistante (Dalkara et Arsava, 2012). An et al. (2011) ont mis en évidence une hétérogénéité importante de la qualité de la reperfusion, tant spatiale que temporelle,

chez des patients traités par le rt-PA après un AVCi. Chez certains patients, la reperfusion du tissu a été suivie d'une phase secondaire d'hypoperfusion, et ces régions d'hypoperfusion ont été associées à une augmentation du volume de l'infarctus (An et al., 2011).

La recanalisation de l'artère peut parfois ne pas suffire à obtenir une amélioration fonctionnelle car cette recanalisation peut être suivie d'une réocclusion du vaisseau (Burgin et Alexandrov, 2001). Rubiera et al. (2005) ont montré que parmi les patients chez qui le rt-PA a entraîné une recanalisation, 20% présentent une réocclusion du vaisseau. Ce taux est en accord avec l'étude d'Alexander et Grotta (26%) (Alexandrov et Grotta, 2002). Enfin, d'après Saqqur et al. (2007a), le taux de réocclusion atteint 30%. Ces réocclusions surviennent en moyenne 65 minutes \pm 55 minutes après l'administration du rt-PA et 43 minutes \pm 41 minutes après la recanalisation (Rubiera et al., 2005).

Il est important de noter que les réocclusions sont plus fréquentes après une recanalisation partielle que complète. De même, elles sont plus souvent observées après une lyse lente ou graduelle du caillot qu'après une lyse soudaine. Enfin, plus la recanalisation est tardive, plus le risque de réocclusion est important (Rubiera et al., 2005).

Le profil clinique des patients avec réocclusion peut se caractériser par un épisode bref d'amélioration neurologique (lié à la recanalisation) suivi d'une aggravation de l'état clinique (correspondant à la réocclusion).

Les réocclusions sont des facteurs de mauvais pronostic. A trois mois, les patients ayant présenté une recanalisation suivie d'une réocclusion montrent une détérioration neurologique plus importante et un taux de mortalité plus élevé que les patients avec recanalisation sans réocclusion. En revanche, ils présentent une meilleure amélioration et un plus faible taux de mortalité par rapport aux patients qui n'ont bénéficié d'aucune recanalisation. Bien que la phase de recanalisation qui précède la réocclusion soit brève, elle semble donc néanmoins avoir un effet bénéfique pour ces patients par rapport à des patients sans aucune recanalisation (Alexandrov et Grotta, 2002).

b) Mécanismes

En préclinique, quelques études ont souligné la survenue d'une hypoperfusion après traitement par le rt-PA. En effet, dans des modèles d'ischémie cérébrale, l'administration de rt-PA ne restaure que partiellement le débit sanguin cérébral (DSC) et entraîne ensuite une hypoperfusion secondaire (Niessen et al., 2002; Kilic et al., 2001; Franke et al., 2000; Busch et al., 1998). Les travaux de Busch et collaborateurs (1998) réalisés chez le rat dans un modèle d'ischémie cérébrale par injection d'un caillot, illustrent très bien ce phénomène. Ces travaux ont montré qu'au cours de l'administration du rt-PA, le DSC augmente ; néanmoins, à la fin du traitement, la reperfusion n'est pas totale puisque le DSC n'atteint que 52% de sa valeur initiale. Une phase d'hypoperfusion secondaire est ensuite

observée dans le cœur de la lésion car dès l'arrêt du traitement, la perfusion diminue progressivement jusqu'à atteindre une valeur finale de 31%. En revanche, en bordure de la lésion, le DSC continue d'augmenter même après l'arrêt du traitement ; mais au bout de 2 heures, le DSC n'a pas retrouvé sa valeur initiale puisqu'il reste inférieur à 70%.

Il est important de noter que les mécanismes à l'origine de l'hypoperfusion observée après la recanalisation ont été étudiés pour la plupart dans des modèles d'ischémie transitoire où la recanalisation est « mécanique » (grâce au retrait d'un filament ou d'un clip qui occlut l'artère) et non induite par le rt-PA (voir les détails des mécanismes dans le chapitre I paragraphe IV). Pour autant, des études suggèrent que les mécanismes seraient similaires (An et al., 2011). Il est cependant important de rester prudent quant à cette extrapolation car une recanalisation rapide provoquée par la cessation d'une occlusion mécanique pourrait affecter différemment la microcirculation par rapport à une recanalisation plus lente lors de la thrombolyse.

Actuellement, les mécanismes exacts de l'hypoperfusion observée après traitement par le rt-PA n'ont pas été clairement identifiés en clinique, mais sur la base d'études expérimentales, des pistes de recherche sont en cours d'exploration (Balami et al., 2013) :

- L'action thrombolytique du rt-PA pourrait favoriser la formation de micro-thrombi secondaires issus de la fragmentation du caillot initial. Ces fragments de caillot (emboles) sont capables de migrer et de se loger dans le réseau vasculaire distal, dans des zones difficilement accessibles par le rt-PA ; ces emboles conduisent à des lésions tissulaires secondaires.

Très peu d'études précliniques se sont intéressées à ces micro-emboles secondaires après traitement par le rt-PA (Balami et al., 2013). Notons néanmoins l'étude de Jiang et al. (2000) réalisée chez le rat, qui a mis en évidence l'apparition de lésions secondaires dans les heures qui suivent la thrombolyse, et que les auteurs ont associée à la présence de micro-emboles provenant de la fragmentation du caillot retrouvés en aval de l'occlusion dans des zones hypoperfusées.

En clinique, des fragments de caillot ont également été retrouvés après administration de rt-PA. Des emboles ont été localisés dans le réseau vasculaire cérébral distal, mais aussi en périphérie, au niveau cardiaque, ou même au niveau des membres inférieurs (Gomez-Beldarrain et al., 2006; Meissner et al., 2006; Yasaka et al., 1994).

- Les micro-thrombi secondaires peuvent non seulement provenir de la fragmentation du caillot initial, mais peuvent être également formés *in situ* dans les microvaisseaux. En effet, des études montrent que le rt-PA peut entraîner des perturbations du système de coagulation. En

particulier, les travaux de Kilic et al. (2001) ont montré qu'après une ischémie cérébrale chez la souris, l'administration d'héparine associée au rt-PA exerce un effet protecteur car elle s'oppose à la diminution du flux sanguin cérébral induite par le rt-PA. Des études ont précisé les mécanismes qui pourraient expliquer cet effet:

- Fassbender et al. (1999) ont montré que le rt-PA est paradoxalement capable d'activer la cascade de la coagulation et d'augmenter l'activité de la thrombine dans les heures qui suivent la thrombolyse. Ils ont notamment montré une augmentation importante des monomères de fibrine circulants entre 1 heure et 5 heures après la thrombolyse. Une hypothèse proposée pour expliquer l'activité pro-coagulante du rt-PA serait qu'en lysant le caillot, le rt-PA non seulement expose la thrombine contenue dans le thrombus, mais pourrait également en libérer dans la circulation (Mirshahi et al., 1989; Bloom, 1962). En effet, lors de la formation des caillots, des quantités importantes de thrombine sont piégées, ce qui permet de la protéger de ses inhibiteurs. Lors de la lyse du caillot, la thrombine devient accessible et active alors les plaquettes et accélère la coagulation. De plus, après la thrombolyse, la thrombine reste liée aux produits de dégradation de la fibrine dans lesquels, protégées de ses inhibiteurs, elle continue de participer à la cascade de coagulation (Weitz et al., 1998).
 - Le rt-PA, au même titre que la thrombine, est capable de cliver les fibrinopeptides A et B du fibrinogène, étape importante de la synthèse de fibrine (se référer au chapitre I, paragraphe I.1) (Weitz et al., 1988).
 - De plus, plusieurs études, dont les travaux de Paganelli et al. (1999) réalisés sur du plasma de patients victimes d'infarctus du myocarde, ont montré que l'administration de rt-PA entraîne paradoxalement une augmentation des taux circulants de son propre inhibiteur, PAI-1. Ces données suggèrent que cette augmentation pourrait contribuer à la survenue des réocclusions après thrombolyse. Parmi les mécanismes qui conduisent à l'augmentation des taux de PAI-1, le rt-PA semblerait augmenter la synthèse de PAI-1 (Fujii et al., 1990) et cet effet pourrait être dû aux produits de dégradation de la fibrine (Hagood et al., 1996). D'autres études suggèrent que la plasmine pourrait être impliquée dans l'augmentation non pas de la synthèse de PAI-1 mais de son activité (Shi et al., 1992).
- Le rt-PA, en tant que protéase, peut cliver d'autres protéines que le plasminogène, comme certains composants de la lame basale. La dégradation de la lame basale pourrait contribuer à fragiliser le vaisseau et donc à la mauvaise perfusion.

- Selon des études précliniques, le rt-PA semblerait interférer avec la réactivité vasculaire (Nassar et al., 2004; Cipolla et al., 2000). En effet, Nassar et al. (2004) ont étudié les effets du rt-PA sur la vasoréactivité d'aortes isolées. Ils ont montré qu'à de faibles concentrations (1 nmol/l), le rt-PA inhibe la vasoconstriction induite par la phényléphrine. En revanche, à des concentrations plus élevées et cliniquement plus pertinentes (20 nmol/l), le rt-PA augmente l'effet vasoconstricteur de la phényléphrine. Cipolla et collaborateurs (2000) ont également étudié les effets du rt-PA *ex vivo*, mais à partir d'artères cérébrales isolées issues de rats soumis à une ischémie cérébrale. Ces travaux ont démontré que le rt-PA augmente la perte de réactivité vasculaire post-ischémique.

Par ailleurs, il a été montré dans une étude expérimentale que le rt-PA entraîne une diminution de l'expression la NOS endothéliale après une ischémie cérébrale (Kilic et al., 2005).

Ces effets sur la vasomotricité de l'endothélium pourraient donc contribuer à l'hypoperfusion observée après la thrombolyse mais les mécanismes doivent encore être précisés.

- Le rt-PA, en altérant l'intégrité de la BHE au cours d'une ischémie, participe à l'apparition d'un œdème cérébral (Koudstaal et al., 1988). En effet, des études précliniques montrent que l'administration du rt-PA aggrave l'œdème induit dans les 24 heures qui suivent l'ischémie (Won et al., 2014; Zuo et al., 2014; García-Yébenes et al., 2011; Ishiguro et al., 2010). Néanmoins, notons que d'autres études expérimentales ont présenté des résultats contradictoires où le rt-PA n'entraîne pas d'effet délétère sur l'œdème à 24 heures (Teng et al., 2013; El Amki et al., 2012; Kilic et al., 2001).

3. Conclusion

Lors d'une ischémie cérébrale, la présence de t-PA endogène peut parfois suffire pour permettre la recanalisation du vaisseau occlus (figure 16). Toutefois, dans la majorité des cas, l'administration de t-PA exogène (rt-PA) est nécessaire, même si en réalité, moins de 2% des patients peuvent en bénéficier. De plus, près de 70% des patients traités ne seront pas de bons répondeurs au rt-PA. L'inefficacité de ce traitement peut être partielle (recanalisation partielle) voire totale (absence de recanalisation). Par ailleurs, après la lyse du thrombus par le rt-PA, une réocclusion peut être observée, à laquelle le rt-PA pourrait paradoxalement participer.

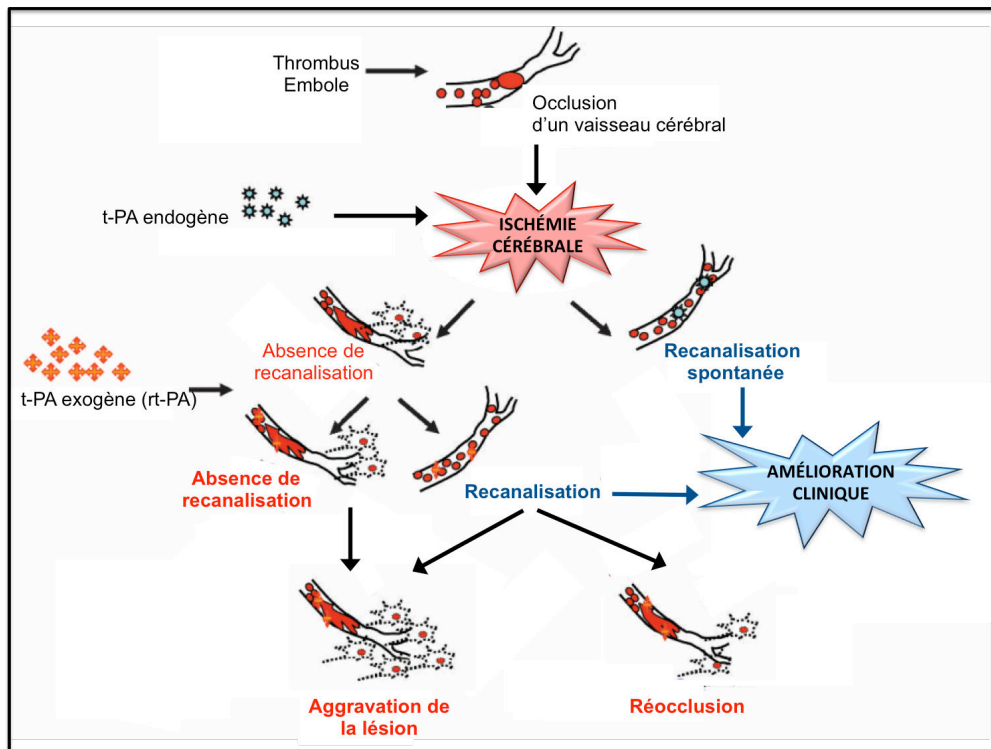


Figure 16 : Ischémie cérébrale et thrombolyse en clinique (adaptée d'après Kaur et al., 2004)

Outre son faible taux d'efficacité et le risque de réocclusion, le rt-PA est à l'origine d'hémorragies intracérébrales qui constituent l'effet indésirable principal de ce traitement. Il a également été montré que le rt-PA possède une toxicité neuronale.

IV. rt-PA, l'envers du décor : risque hémorragique et toxicité neuronale

1. Transformations hémorragiques

a) Transformations hémorragiques spontanées à la suite d'un AVC

A la suite d'une ischémie cérébrale, des hémorragies intracérébrales peuvent survenir de façon spontanée. Ce risque de transformations hémorragiques (TH) concerne en moyenne 10 à 40% des patients mais ces chiffres sont très variables d'une étude à l'autre (Jickling et al., 2014; Terruso et al., 2009; Lindley et al., 2004). Les TH peuvent être particulièrement délétères chez certains patients car elles sont parfois associées à une augmentation de la morbi-mortalité (Jickling et al., 2014; Khatri et al., 2007; Berger et al., 2001; Fiorelli et al., 1999).

La survenue de ces TH dites spontanées est liée à l'augmentation de la perméabilité de la BHE au cours de l'ischémie, qui a été mise en évidence tant d'un point de vue clinique que d'un point de vue expérimental (Latour et al., 2004). Des études précliniques ont montré que l'ouverture de la BHE est

associée à des modifications post-ischémiques de l'expression d'une part, des protéines de jonctions inter-endothéliales (jonctions serrées et adhérentes) et d'autre part, des constituants de la membrane basale (voir pour revue Jickling et al., 2014). Parmi les mécanismes à l'origine de la dégradation de la BHE, les métalloprotéases de la matrice (MMP) jouent un rôle central, en particulier les MMP-2, -9, -10, -13 (Cuadrado et al., 2009; Rosell et al., 2005; Rosenberg et al., 1996). Le second mécanisme induisant une atteinte post-ischémique de la BHE est le stress oxydant et la surproduction de radicaux libres qui sont capables d'altérer les cellules endothéliales. Enfin, les processus inflammatoires participent également à la perte de l'intégrité de la barrière. En particulier, il a été montré que les neutrophiles qui infiltrent le parenchyme cérébral, sont des sources majeures de radicaux libres et de MMPs (Lakhan et al., 2009).

b) Transformations hémorragiques induites par le rt-PA

A la suite d'une ischémie, le risque de survenue des TH peut être fortement augmenté lors de l'administration du rt-PA, ce qui constitue la complication majeure de ce traitement. En effet, le rt-PA multiplie par 6 la fréquence de survenue des TH post-ischémiques en clinique (Hacke et al., 2004) ; ce risque hémorragique est associé à une détérioration neurologique des patients. Notons qu'actuellement, aucune donnée clinique n'a mis en évidence une corrélation entre le délai d'administration du rt-PA et la fréquence ou la sévérité des TH (Hacke et al., 2004).

Il a été montré en clinique comme dans des modèles expérimentaux que les TH induites par le rt-PA sont, comme les TH spontanées, liées à une altération de l'intégrité de la BHE (Abu Fanne et al., 2010). A l'heure actuelle, les mécanismes à l'origine de la toxicité vasculaire du rt-PA ne sont pas entièrement élucidés. Néanmoins, plusieurs pistes de recherche ont été développées :

- Le rt-PA et la plasmine, de par leur activité protéolytique, participeraient à la dégradation des composants de la BHE.
- En préclinique, différents travaux ont mis en évidence après administration de rt-PA, une augmentation de l'expression et de l'activité de plusieurs types de MMP dont les MMP-2, -3 et -9 (Lenglet et al., 2014b; Suzuki et al., 2011; Burggraf et al., 2007; Wang et al., 2004; Sumii et Lo, 2002). De plus, il existe en clinique une corrélation entre l'augmentation des taux de MMP-9 plasmatiques et la survenue de TH chez les patients traités par le rt-PA (Montaner et al., 2003).

Le rt-PA pourrait augmenter les taux de MMP selon différents mécanismes d'action :

- L'action protéolytique du rt-PA et de la plasmine peut permettre le clivage et l'activation des pro-MMP (Lukic-Panin et al., 2010).

- Le rt-PA augmente l'adhésion et la dégranulation des PMN (polymorphonucléaires) qui sont des réservoirs importants de MMP-9 (Cuadrado et al., 2008; Montrucchio et al., 1996).
- Le rt-PA, en se liant aux récepteurs LRP, entraîne une augmentation des taux de MMP (Wang et al., 2003; Yepes et al., 2003) ainsi que le détachement des pieds astrocytaires à l'origine d'une atteinte de l'intégrité de la BHE (Polavarapu et al., 2007).
- Par ailleurs, le rt-PA serait à l'origine d'une aggravation du stress oxydant et de l'inflammation post-ischémiques. En effet, le rt-PA augmente l'adhésion et la dégranulation des PMN, qui sont des sources de radicaux libres et de cytokines (Cuadrado et al., 2008; Montrucchio et al., 1996). Il a également été montré que le rt-PA participe à la diapédèse des monocytes à travers l'endothélium cérébral (Reijerkerk et al., 2008). De plus, l'expression de la NO-synthase inducible (NOSi) est augmentée par l'activation du LRP par le rt-PA (*via* le facteur de transcription NF- κ B ; X. Zhang et al., 2007).
- Enfin, à la suite de la thrombolyse, la reperfusion elle-même peut paradoxalement induire des effets délétères sur l'endothélium notamment en augmentant la production de radicaux libres et en favorisant l'arrivée de leucocytes (Gourdin et al., 2009; Warach et Latour, 2004).

En dehors de cette toxicité vasculaire bien connue du rt-PA, il a été montré qu'il exerce également une toxicité neuronale.

2. Toxicité neuronale

Le rt-PA est capable de franchir la BHE, qu'elle soit intacte ou altérée par l'ischémie (Benchenane et al., 2005a, 2005b). Au sein du parenchyme cérébral, le rt-PA exerce des effets délétères et en particulier une toxicité neuronale qui est notamment liée aux phénomènes d'excitotoxicité (voir pour revues Vivien et al., 2011; Yepes et al., 2009; Kaur et al., 2004). Il a été montré que le rt-PA, en clivant la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA grâce à son domaine « Kringle 2 », potentialise l'activation de ce récepteur, ce qui aggrave la cascade excitotoxique post-ischémique (Nicole et al., 2001). Enfin, le rt-PA entraîne, *via* une interaction avec le récepteur de type Annexine-II ou encore avec le récepteur LRP1, une activation des cellules microgliales. Cette activation microgliale est à l'origine d'une réaction inflammatoire, d'une augmentation de la NOSi et contribue ainsi à la neurotoxicité du rt-PA (C. Zhang et al., 2009; Siao et Tsirka, 2002).

V. Conclusion et alternatives

Au vu de l'ensemble des données ci-dessus, il semble donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes capables de modifier l'efficacité et la toxicité du rt-PA ; ceci pourrait notamment permettre de définir de nouveaux marqueurs afin de pouvoir sélectionner les patients chez qui le rt-PA est susceptible d'être efficace et/ou avec un moindre risque toxique. Pour les autres patients, d'autres stratégies, dont certaines sont détaillées ci-dessous, pourraient être employées (Saver, 2011; Mahagne, 2008). Actuellement à l'étude, ces stratégies visent à (1) augmenter l'efficacité de la thrombolyse induite par le rt-PA afin d'améliorer la reperfusion des vaisseaux occlus, (2) diminuer les effets délétères du rt-PA, *i.e.* sa toxicité vasculaire et neurologique.

Afin de permettre une meilleure reperfusion du tissu associée à un plus faible risque de TH et de réocclusions, de nouveaux agents thrombolytiques ont été développés et sont actuellement testés en clinique. Citons à titre d'exemple la **tenecteplase**, la **retéplase** et la **desmotéplase**. Cette dernière est synthétisée à partir de salive de chauve-souris, et possède une haute affinité pour la fibrine. La desmotéplase est de plus dépourvue du domaine « Kringle 2 », et ainsi, à la différence du rt-PA, elle ne se lie pas à la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA et ne potentialise donc pas l'excitotoxicité post-ischémique.

Plus récemment, Parcq et al. (2013) ont développé deux mutants du t-PA : une forme non clivable de la chaîne simple du t-PA appelée **sc*-t-PA**, et le **K2*-t-PA** qui possède un domaine « Kringle 2 » modifié. La caractérisation de ces deux nouvelles formes de t-PA est particulièrement encourageante puisque ces mutants présentent une neurotoxicité plus faible que celle du t-PA tout en préservant une bonne activité fibrinolytique. Macrez et al. (2011) ont développé un anticorps s'opposant spécifiquement à l'interaction du rt-PA avec la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA. Dans un modèle murin d'ischémie cérébrale, cette immunothérapie a permis de réduire de manière importante la lésion et les déficits neurologiques.

Des études ont également examiné l'intérêt d'une autre voie d'administration du rt-PA, **la voie intra-artérielle**. Cette voie permet d'administrer le thrombolytique au plus près du caillot afin d'entraîner une lyse plus efficace du thrombus. Certaines études ont même évalué l'efficacité d'une **administration combinée** : une administration rapide du thrombolytique par voie intraveineuse associée à une administration à proximité du caillot par voie intra-artérielle (voir pour revue Micieli et al., 2009). La méta-analyse de Rha et Saver (2007) montre que le taux de recanalisation par voie intraveineuse est de 46% contre 63% par voie intra-artérielle, et que ce taux atteint 68% lorsque ces deux voies sont associées.

Par ailleurs, en cas de contre-indication du rt-PA ou d'échec de la thrombolyse, l'abord intra-artériel permet la **thrombolyse mécanique** (Khalessi et al., 2011). La thrombectomie mécanique est assurée par voie endovasculaire grâce à un dispositif médical tel que le dispositif MERCI® (Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia). Ce système de capture du caillot a obtenu l'approbation de la FDA aux Etats-Unis en 2004, et en France, son utilisation est conseillée chez les patients non éligibles au rt-PA (recommandations 2009 de l'HAS, www.has-sante.fr). Le deuxième dispositif à avoir été approuvé par la FDA est le système PENUMBRA® ; il s'agit d'un système de thromboaspiration. Notons que plusieurs autres dispositifs sont actuellement en cours d'évaluation en clinique. Bien que le taux de recanalisation soit particulièrement élevé lors d'une thrombolyse mécanique (84% ; Rha et Saver, 2007), cette technique n'est pas dénuée de risque puisqu'elle peut être à l'origine d'un risque infectieux, d'une dissection du vaisseau, d'hémorragies, d'hématomes, de spasmes vasculaires ou encore d'une fragmentation du caillot avec un risque de réocclusion.

Une autre stratégie consiste à associer au rt-PA des ultrasons délivrés par doppler transcrânien (**sonothrombolyse**). Les ultrasons altèrent la structure du thrombus, facilitent la pénétration du rt-PA dans le caillot et potentialisent ainsi la thrombolyse. Néanmoins, des investigations complémentaires du rapport bénéfice/risque de cette technique sont encore nécessaires.

Afin de diminuer la neurotoxicité et la toxicité vasculaire du rt-PA, tout en préservant son activité thrombolytique, un nombre croissant d'études précliniques porte sur l'association au rt-PA de stratégies ayant démontré leur capacité neuroprotectrice et/ou vasculoprotectrice dans des modèles expérimentaux (Ishrat et al., 2012) ; citons par exemple, parmi les plus étudiées, les associations avec des anti-oxydants ou des inhibiteurs de MMP. Au laboratoire, nous nous intéressons tout particulièrement à une enzyme : la **poly(ADP-ribose) polymérase (PARP)**. L'inhibition de la PARP, qui présente des effets protecteurs dans des modèles murins d'ischémie cérébrale, s'oppose également à certains effets délétères du rt-PA (Haddad et al., 2013; Teng et al., 2013; Haddad et al., 2008; El Amki et al., en préparation). L'inhibition de la PARP représente donc une stratégie thérapeutique particulièrement prometteuse à associer au rt-PA ; cette enzyme fait l'objet du chapitre suivant.

QUATRIÈME CHAPITRE : LA POLY (ADP-RIBOSE) POLYMÉRASE OU PARP

La famille des poly(ADP-ribose)polymérase (PARPs) comprend, d'après les connaissances actuelles, 17 isoformes d'enzymes (Amé et al., 2004). Six d'entre-elles présentent une activité de poly(ADP-ribosyl)ation (les PARP-1, -2, -3 et -4, et les tankyrases-1 et -2), alors que les autres membres de la famille catalysent la mono(ADP-ribosyl)ation (Riffell et al., 2012; Kleine et al., 2008; Amé et al., 2004). Il est important de souligner que la **PARP-1** est la protéine la plus abondante de la famille. La PARP-1 est une enzyme constitutive, ubiquitaire et abondamment retrouvée dans l'organisme. Elle est principalement localisée dans le noyau, associée à la chromatine, mais elle a également été retrouvée dans les centrosomes (Kanai et al., 2000). D'autres études ont montré que la PARP-1 serait présente aussi dans la mitochondrie (Lai et al., 2008; Du et al., 2003). La PARP-1 est responsable de près de 90% de l'activité de poly(ADP-ribosyl)ation, et son hyperactivation à la suite d'une ischémie cérébrale a été largement démontrée. Par conséquent, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à cette isoforme dans la suite de ce travail.

I. La PARP-1 : structure et fonctionnement

1. Structure de la PARP-1

La PARP-1 est composée de 1014 acides aminés ; sa masse moléculaire est de 113 kDa. Cette enzyme est constituée de 3 domaines indispensables à son fonctionnement, comme l'illustre la figure 17 (Moroni, 2008) :

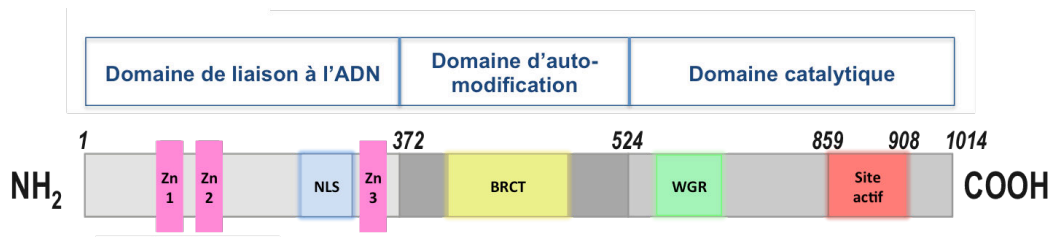


Figure 17 : Représentation de la structure de la PARP-1 (modifiée d'après Fatokun et al., 2014)

Zn : motif en doigt de zinc ; NLS : nuclear localisation signal ; BRCT : breast cancer susceptibility protein-C terminus ; WGR : motif riche en tryptophane (W), en glycine (G) et en arginine (R)

➤ Le domaine de liaison à l'ADN

Ce domaine situé à l'extrémité N-terminale comprend 3 motifs en doigts de zinc (Zn1, Zn2 et Zn3) qui reconnaissent les cassures de l'ADN et permettent à l'enzyme de s'y fixer. Ce domaine

contient également un motif NLS (nuclear localisation signal) qui explique la présence de la PARP-1 dans le noyau, et qui contient un site de clivage par la caspase-3.

➤ **Le domaine d'auto-modification**

Il existe dans ce domaine un motif de liaison des poly(ADP-riboses) ou PARs : le PBM (PARs binding motif). Ce motif permet à la PARP-1 de s'auto-poly(ADP-ribosyler. Par ailleurs, le motif BRCT (breast cancer type 1 C-terminus) est à l'origine des interactions entre la PARP-1 et ses partenaires nucléaires.

➤ **Le domaine catalytique**

Le domaine catalytique est situé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Il contient une région appelée WGR car riche en tryptophane (W), en glycine (G) et en arginine (R). Après la liaison de la PARP-1 à l'ADN, la région WGR conduit au changement de conformation de l'enzyme, nécessaire à la modulation de son site actif. Ce site actif est un site de liaison au NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide) qui est le substrat de la PARP-1.

2. Fonctionnement de la PARP-1 : la poly(ADP-ribosylation)

La PARP est l'enzyme clé de la poly(ADP-ribosylation), encore appelée PARylation, qui consiste à synthétiser des PARs puis à les greffer de manière covalente à une protéine acceptrice (voir pour revues Gibson et Kraus, 2012; Schreiber et al., 2006).

La réaction de poly(ADP-ribosylation) est un processus dynamique et réversible qui dépend de l'équilibre fonctionnel entre deux enzymes : la PARP, qui synthétise les PARs, et la poly(ADP-ribose)glycohydrolase ou PARG, qui les dégrade.

a) Synthèse des PARs

En condition physiologique, l'activité basale de la PARP-1 est faible. En revanche, cette enzyme devient très active en réponse à des lésions de l'ADN. Il a également été décrit que la PARP-1 peut être activée suite à des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation) (Kauppinen et al., 2006; Walker et al., 2006; Hassa et al., 2005) ou encore à la suite d'interactions avec d'autres protéines telles que ERK1/2 et JNK (Cohen-Armon et al., 2007; S. Zhang et al., 2007).

Une fois activée, la PARP clive le NAD⁺ et libère d'une part du nicotinamide, et d'autre part, une unité ADP-ribose qu'elle transfère à une protéine cible par une liaison covalente (figure 18).

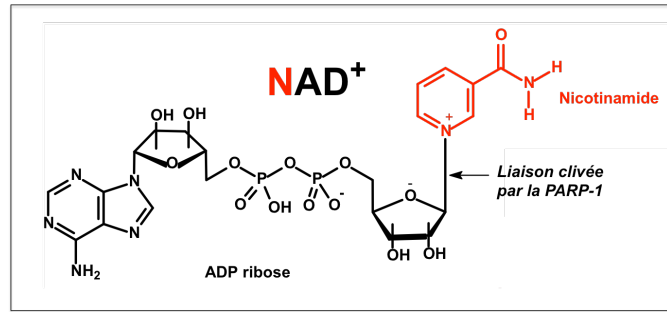


Figure 18 : Structure d'une molécule de NAD⁺ et site de clivage par la PARP (d'après Curtin et Szabo, 2013)

Cette première étape de mono(ADP-ribosyl)ation est suivie d'une étape d'élongation de la chaîne puisque d'autres unités d'ADP-riboses sont greffées les unes à la suite des autres de façon linéaire par des liaisons (1'-2') ribose-ribose (figure 19). Ce polymère d'ADP-riboses peut contenir près de 200 unités d'ADP-riboses. Enfin, cette chaîne linéaire sera complétée par des ramifications d'ADP-riboses qui forment des « branches ».

Le nicotinamide produit lors de la première étape de PARylation est recyclé en NAD⁺ grâce à l'action de deux enzymes : la nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT) puis la nicotinamide mononucléoside adényltransférase (NMNAT). Notons que la régénération d'une molécule de NAD⁺ nécessite la consommation de 4 molécules d'ATP.

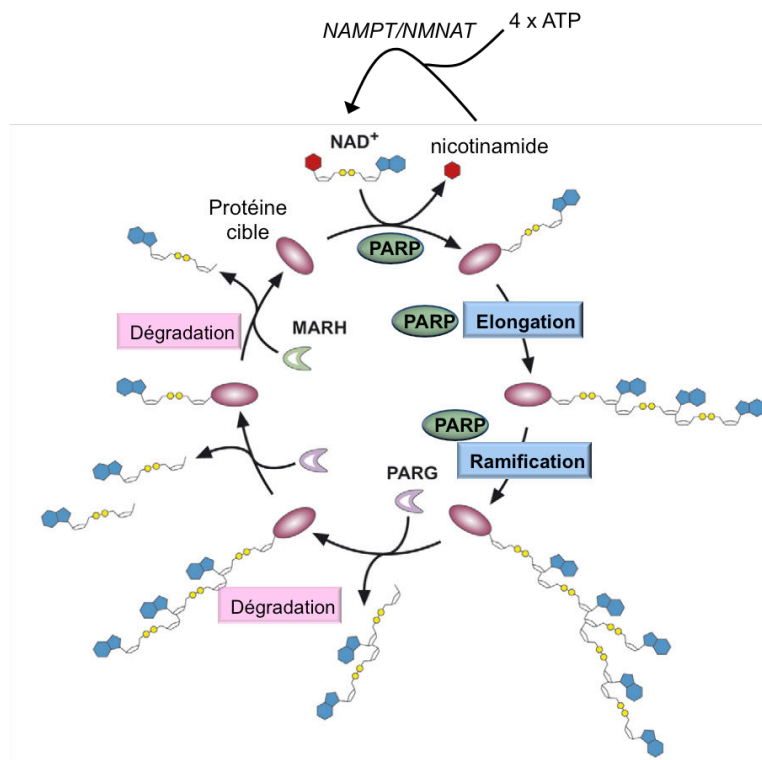


Figure 19 : La poly(ADP-ribosyl)ation : synthèse et dégradation des PARs, régénération du NAD⁺ (modifiée d'après Heeres et Hergenrother, 2007)

NAMPT : nicotinamide phosphoribosyltransférase ; NMNAT : nicotinamide mononucléoside adényltransférase ; PARG : poly(ADP-ribose)glycohydrolase ; MARH : mono(ADP-ribosyl)protéine hydrolase.

Jusqu'à présent, plus de 40 protéines cibles de la PARP ont été identifiées, mais la principale reste la PARP elle-même puisque l'enzyme est capable de s'auto-poly(ADP-ribosyl)er. Les autres protéines acceptrices de PARs sont les histones, des facteurs de transcription ou encore des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN.

Notons que toutes ces protéines contiennent le motif PBM (motif de liaison des PARs) qui chevauche fréquemment leur domaine fonctionnel. C'est donc pour cela que les PARs peuvent être à l'origine d'une altération du fonctionnement de leurs cibles.

Le principal mécanisme de régulation de l'activité de la PARP-1 concerne son auto-poly(ADP-ribosylation). En effet, l'ajout progressif d'ADP-riboses sur l'enzyme charge la PARP de plus en plus négativement, ce qui entraîne une répulsion électrostatique *vis-à-vis* de sa cible (ADN ou autre protéine), et conduit ainsi à son détachement.

b) Dégradation des PARs

Les PARs formés par la PARP-1 ont une demi-vie très courte. En effet, au bout de quelques minutes seulement, ces derniers sont dégradés par la poly(ADP-ribose)glycohydrolase ou PARG (Gibson et Kraus, 2012). Grâce à ses activités exo- et endo-glycosidiques, la PARG dégrade très rapidement les PARs présents sur la chaîne linéaire principale et au niveau des ramifications (figure 19).

La PARG est, tout comme la PARP, une enzyme ubiquitaire. Elle est présente dans le noyau des cellules mais également dans les mitochondries et le cytoplasme. Cette enzyme contient le motif NLS (nuclear localisation signal) qui permet son adressage nucléaire, mais également le motif NES (nuclear export signal) qui est un signal d'exportation nucléaire. La PARG serait donc capable de migrer entre le noyau et le cytoplasme. Suite à des dommages de l'ADN en situations pathologiques, on observe d'ailleurs une translocation vers le noyau.

Par ailleurs, notons que la PARG est faiblement présente dans le noyau et en quantité bien inférieure à celle de la PARP ; néanmoins, ceci est compensé par le fait que cette enzyme possède une activité spécifique très élevée.

Enfin, d'autres enzymes, comme la mono(ADP-ribosyl)protéine hydrolase (MARH), sembleraient intervenir pour permettre l'hydrolyse de la liaison entre le dernier monomère d'ADP-ribose et la protéine acceptrice.

II. Rôles bénéfiques de la PARP en conditions physiologiques

Lors de la PARylation, les modifications post-traductionnelles des protéines cibles de la PARP sont impliquées dans différents mécanismes comme la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription de gènes ou encore la régulation du cycle cellulaire (voir pour revue Schreiber et al., 2006).

1. Réparation de l'ADN et stabilité du génome

Des milliers de cassures au niveau de l'ADN se produisent tous les jours dans une cellule. Les systèmes de réparation activement présents dans les cellules ont pour rôle de réparer ces anomalies de l'ADN. Ils assurent ainsi le maintien de la stabilité génomique. Il est maintenant bien établi que la PARP participe à ces processus de réparation de l'ADN (D'Amours et al., 1999). Des études ont montré que des souris PARP-1^{-/-} sont extrêmement sensibles aux agents alkylants ou encore aux rayonnements γ . Ces animaux présentent notamment des déficits de réparation de l'ADN et des anomalies chromosomiques importantes (Shibata et al., 2009, 2005; Ménissier de Murcia et al., 2003; de Murcia et al., 1997).

Dans les 15 à 30 secondes qui suivent l'apparition de cassures simple ou double brin de l'ADN, l'activité de la PARP-1 est largement augmentée (de 10 à 500 fois) (Rouleau et al., 2010). Grâce à ses motifs en doigts de zinc, la PARP-1 se fixe sur les zones endommagées de l'ADN ; puis l'enzyme entraîne la poly(ADP-ribosyl)ation de protéines cibles, principalement les histones H1 et H2B mais également d'autres protéines nucléaires qui seront par la suite recrutées telles que XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein-1), l'ADN-polymérase III et l'ADN-ligase III (figure 20). L'encombrement stérique et la répulsion électrostatique entre les charges négatives des PARs fixés sur les histones et celles de l'ADN entraînent le passage d'une forme super-enroulée de l'ADN à une forme plus relâchée. La relaxation de la chromatine permet ainsi aux systèmes de réparation de l'ADN d'accéder aux zones lésées.

Notons que lors du fonctionnement de l'enzyme, la PARP-1 va également catalyser sa propre poly(ADP-ribosyl)ation. La répulsion électrostatique entraîne le détachement de l'enzyme de l'ADN, ce qui conduit à son inactivation.

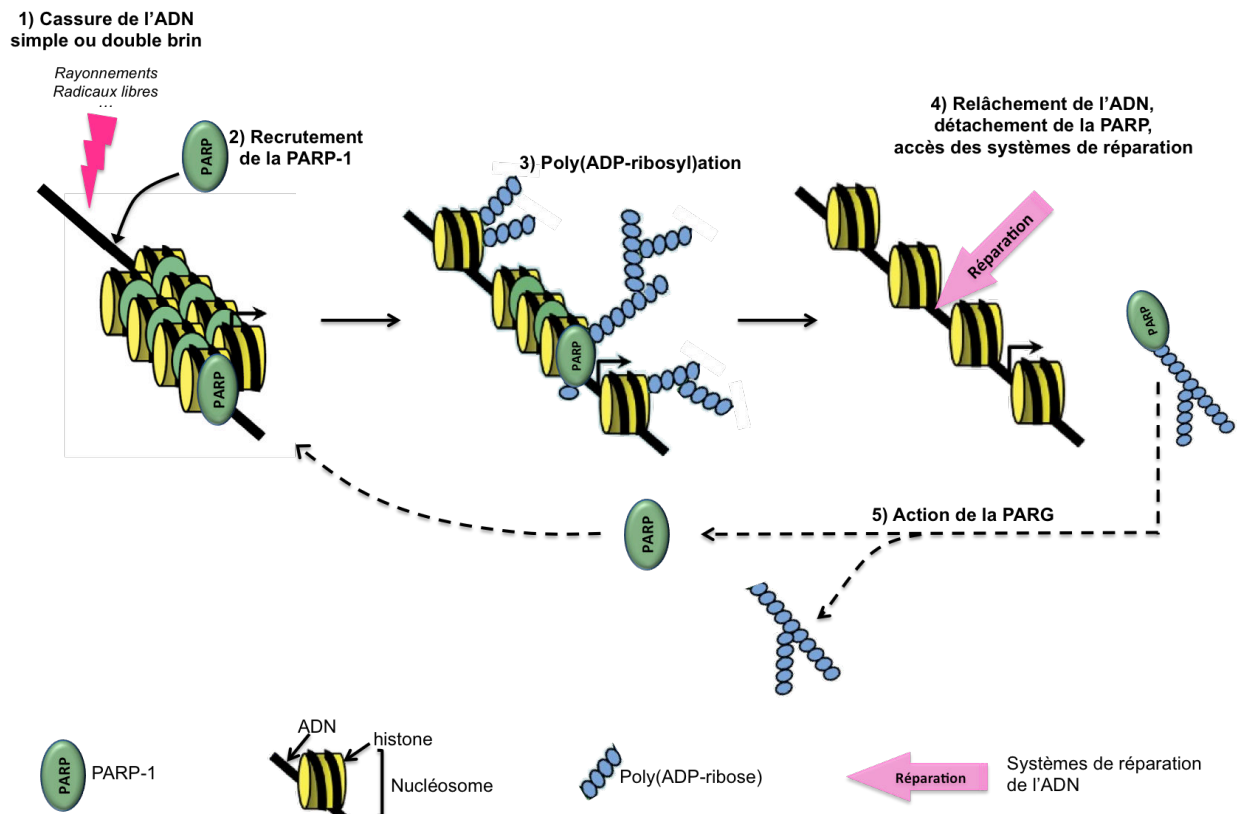


Figure 20 : Rôle de la PARP-1 dans la réparation de l'ADN (modifiée d'après Kraus, 2008)

2. Régulation de la transcription génique

La PARP-1 régule la transcription de certains gènes selon deux mécanismes (voir pour revues Kraus, 2008; Chiarugi, 2002a) :

- comme nous l'avons décrit, la PARP-1 entraîne la relaxation de la chromatine. Les gènes deviennent alors plus accessibles, ce qui permet à des facteurs de transcription de venir interagir avec leurs sites de fixation sur l'ADN.
- La PARP-1 est également capable d'interagir directement avec certains facteurs ou co-facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1 (activator protein-1), ou leurs sites de fixation, ce qui conduit à la répression ou l'activation de certains gènes.

3. Autres fonctions physiologiques de la PARP

Il a également été montré que la PARP, par modulation de l'activité de certaines protéines telles que p53, est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Amé et al., 2004). Enfin, la PARP régule l'activité du protéasome et participe au maintien de la taille des télomères lors de la réplication.

Paradoxalement, bien que la PARP soit une enzyme qui exerce des effets bénéfiques dans les conditions physiologiques, il a été montré que son hyperactivation à la suite de l'ischémie cérébrale est délétère.

III. Rôle délétère de la PARP au cours de l'ischémie cérébrale

1. Activation post-ischémique de la PARP

Au cours de l'ischémie cérébrale, la libération massive de glutamate est à l'origine d'une cascade excitotoxique et d'un stress oxydant. Ceci entraîne de nombreuses cassures de l'ADN et conduit à une activation excessive de la PARP. Cette hyperactivation de l'enzyme a été mise en évidence non seulement dans les neurones mais également dans les cellules endothéliales, les leucocytes, les astrocytes et les cellules microgliales (Moroni et Chiarugi, 2009).

En clinique, Love et collaborateurs ont montré une forte accumulation de PARs dans les noyaux de neurones de patients autopsiés, principalement dans les 2 jours consécutifs à une ischémie globale après arrêt cardiaque (Love et al., 1999). L'activation neuronale de la PARP a également été décrite par Sairanen et al. (2009) dans les 3 jours qui suivent un AVCi. D'autres travaux ont montré que cette activation est en réalité biphasique : une activation précoce essentiellement dans les neurones se met en place dans les 24 heures après l'AVCi, et une phase d'activation plus tardive, entre 3 jours et 1 semaine, principalement dans les cellules inflammatoires (macrophages et lymphocytes) (Love et al., 2000).

En préclinique, l'augmentation de l'activité de la PARP a été mise en évidence dans différents modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale. Cependant, la cinétique d'accumulation des PARs varie selon les études.

Après une ischémie cérébrale transitoire (2 heures) réalisée chez la souris, Endres et al. (1997) ont montré une augmentation de la quantité de PARs dans le cortex cérébral à des temps précoces (après 5 minutes de reperfusion), mais une absence de PARs à des temps plus tardifs (entre 3 et 6 heures).

Dans ce même modèle, d'autres travaux menés par Li et collaborateurs ont mis en évidence une activation de la PARP dès 20 minutes de reperfusion. Cette activation est maximale à 1 heure et retrouve un état basal à 24 heures (Li et al., 2010).

Lors d'une étude réalisée dans un modèle d'ischémie transitoire (90 minutes) chez le rat, une accumulation de PARs a été observée après 1 heure et 6 heures de reperfusion ; et les PARs ne sont plus détectables à 15 heures (Iwashita et al., 2004).

Enfin, les travaux de Tokime et al. (1998) ont décrit une augmentation de l'activité de la PARP entre 2 heures et 8 heures après une ischémie cérébrale permanente réalisée chez le rat, mais cette augmentation n'est plus détectable à 16 heures.

2. Mise en évidence du rôle délétère de la PARP après l'ischémie cérébrale

L'utilisation d'animaux PARP-1^{-/-} ou d'inhibiteurs pharmacologiques de la PARP a permis de montrer que l'hyperactivation de la PARP au cours de l'ischémie cérébrale est particulièrement délétère :

- L'effet délétère de la PARP-1 après une ischémie cérébrale a été montré pour la première fois en 1997 dans deux études réalisées sur des **souris PARP-1^{-/-}** (Eliasson et al., 1997; Endres et al., 1997). La délétion du gène de la PARP a en effet entraîné une diminution de près de 60% du volume de lésion par rapport aux souris sauvages. Goto et al. (2002) ont par la suite confirmé le rôle délétère de la PARP-1 puisqu'ils ont montré que la restauration de l'enzyme par transfection virale du gène de la PARP-1, s'oppose à l'effet protecteur de sa délétion.
- Le rôle délétère de la PARP a ensuite été mis en évidence grâce à l'utilisation d'**inhibiteurs pharmacologiques** de l'enzyme. Il a été montré, notamment au sein de notre laboratoire, que les inhibiteurs de PARP sont neuroprotecteurs puisqu'ils permettent de diminuer les volumes de lésion ainsi que les déficits neurologiques à la suite d'une ischémie cérébrale, qu'elle soit transitoire (Egi et al., 2011; Haddad et al., 2006; Couturier et al., 2003) ou permanente (Egi et al., 2011; Haddad et al., 2008).

La grande majorité des inhibiteurs de PARP ont une structure proche de celle du nicotinamide qui est le métabolite du NAD⁺ et qui est un inhibiteur endogène de la PARP (figure 21). Le NAD⁺ contient un groupement amide nécessaire à son interaction avec la PARP. Ainsi, les inhibiteurs contiennent dans leur structure ce même groupement qui leur permet de rentrer en compétition avec le NAD⁺ et de prendre sa place au niveau du site catalytique de l'enzyme (voir pour revue Curtin et Szabo, 2013).

Le nicotinamide lui-même est un inhibiteur peu puissant puisque sa CI50 (concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de la PARP) est de 210 µM. Les inhibiteurs de PARP ont été développés par modification de la structure du nicotinamide, afin d'augmenter la puissance (diminution de la CI50), la spécificité et la solubilité des produits.

La première classe d'inhibiteurs synthétisés est celle des benzamides dont le chef de file est le 3-aminobenzamide (3-AB ; $CI_{50} = 33 \mu M$). Par la suite, ont été développées d'autres classes d'inhibiteurs plus puissants, avec des CI_{50} de l'ordre du nanomolaire comme les isoquinolinones (ex : 1,5-dihydroxyisoquinoline ou DHIQ ; $CI_{50} = 390 \text{ nM}$), les isoquinolines (ex : MP-124 ; $CI_{50} = 20,8 \text{ nM}$), les isoindolinones (ex : INO-1001 ; $CI_{50} < 10 \text{ nM}$) ou les phénanthridiones (ex : PJ34 ; $CI_{50} = 17 \text{ nM}$) (figure 21).

Par ailleurs, il a été récemment montré qu'une tétracycline, la minocycline, présente des propriétés inhibitrices de PARP ($CI_{50} = 42 \text{ nM}$), ce qui pourrait contribuer aux effets anti-inflammatoires et neuroprotecteurs de la minocycline dans des modèles d'ischémie cérébrale (Chen et al., 2014; Alano et al., 2006).

Le nombre croissant d'inhibiteurs développés au cours de ces dernières années illustre l'intérêt grandissant pour la PARP, non seulement dans le domaine des neurosciences mais également en cardiologie et en cancérologie. Actuellement, une dizaine d'inhibiteurs de PARP sont en essais cliniques, en cancérologie pour la plupart (voir pour revues Dantzer et al., 2011; Virág et Szabó, 2002).

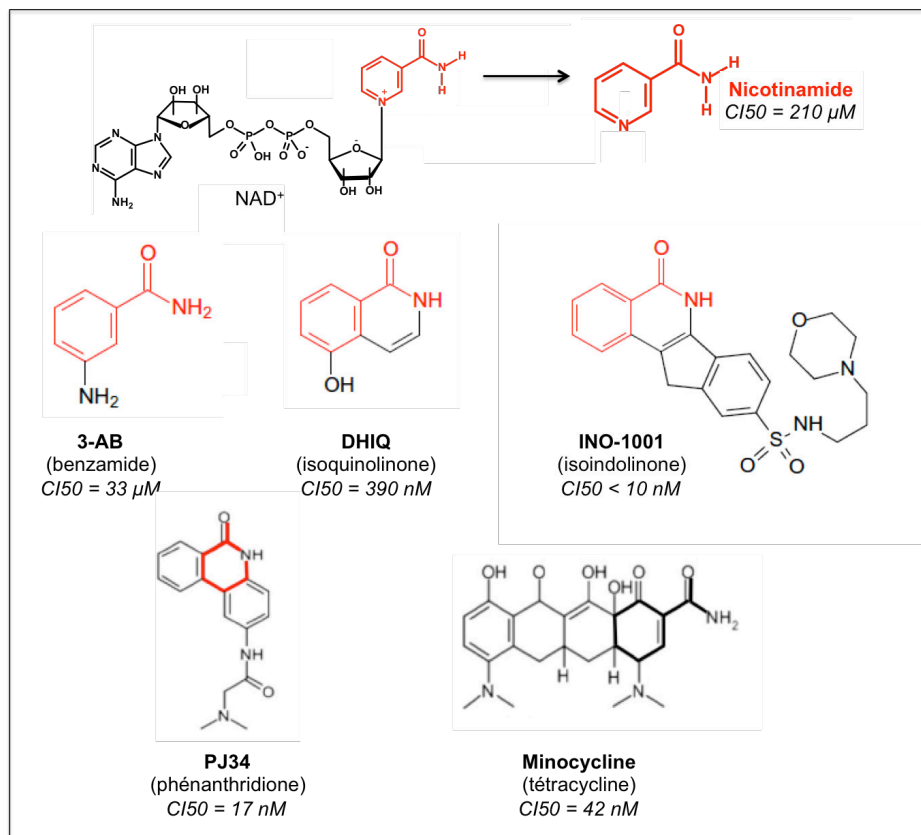


Figure 21 : Structures des principaux inhibiteurs de PARP (d'après Curtin et Szabo, 2013)

3. Mécanismes à l'origine du rôle délétère de la PARP après une ischémie cérébrale

Plusieurs mécanismes sont proposés afin d'expliquer le rôle délétère de la PARP à la suite de l'ischémie cérébrale. La PARP est notamment impliquée dans la mort cellulaire et dans la réaction inflammatoire post-ischémique (voir pour revues : Aredia et Scovassi, 2014; Skaper, 2003).

a) PARP et mort cellulaire

➤ Théorie de la déplétion énergétique et nécrose

En 1985, Berger fut le premier à proposer que l'activation de la PARP, en consommant les stocks de NAD⁺, est à l'origine d'une déplétion énergétique qui peut conduire à la nécrose des cellules (Berger, 1985). Par la suite, cette théorie de la déplétion énergétique a été confirmée, notamment par Schraufstatter et al. (1986). Cette équipe a en effet montré *in vitro* que l'hyperactivation de la PARP suite à un stress oxydant (H₂O₂) entraînait une mort cellulaire de près de 80%, ainsi qu'une chute sévère des taux de NAD⁺ et d'ATP ; l'ajout de 3-AB, inhibiteur de PARP, a permis de préserver les réserves de NAD⁺ et d'ATP, et de s'opposer à la mort cellulaire.

Le NAD⁺ est en effet un acteur essentiel du fonctionnement de certaines voies métaboliques qui conduisent à la production d'ATP, telles que la glycolyse et la respiration mitochondriale. Ainsi, plus la PARP est activée, plus elle consomme du NAD⁺, et moins ce dernier sera disponible pour permettre la synthèse d'ATP (Chiarugi, 2002b). De plus, la déplétion des stocks d'ATP est aggravée lors de la poly(ADP-ribosyl)ation, car comme nous l'avons décrit précédemment, 4 molécules d'ATP seront nécessaires pour renouveler 1 molécule de NAD⁺.

Néanmoins, notons qu'une étude récente réalisée par Andrabi et al. (2014) suggère que la déplétion énergétique observée lors de l'hyperactivation de la PARP-1 serait indépendante de la diminution des taux de NAD⁺, mais serait liée à une inhibition PAR-dépendante d'hexokinase qui entraînerait une inhibition de la glycolyse.

Au cours de l'ischémie cérébrale, la baisse des apports en oxygène et en glucose conduit à une déplétion énergétique. L'hyperactivation post-ischémique de la PARP, à l'origine d'une forte consommation en NAD⁺, pourrait donc aggraver considérablement cette déplétion énergétique qui fait suite à l'ischémie.

En accord avec cette théorie, des études réalisées *in vivo* dans des modèles d'ischémie cérébrale transitoire et permanente ont confirmé la diminution des taux cérébraux de NAD⁺ à la suite de l'ischémie, et ont montré que cette diminution est préservée chez les souris PARP-1^{-/-} ou par le traitement par le 3-AB ou le nicotinamide (Liu et al., 2009; Endres et al., 1997).

Néanmoins, il est important de noter que d'autres travaux, réalisés *in vivo* et *in vitro*, ont contredit ces résultats. Dans ces études, il a été montré d'une part que suite à une ischémie globale ou focale, les taux de NAD⁺ ne sont pas diminués (Nagayama et al., 2000; Paschen et al., 2000), et d'autre part, que les effets protecteurs observés chez des souris PARP-1^{-/-} ou traitées par le 3-AB sont indépendants de la restauration des réserves énergétiques (Chiarugi, 2002b; Goto et al., 2002). L'ensemble de ces résultats suggère donc l'existence d'autres mécanismes expliquant les effets délétères de la PARP.

➤ Apoptose

Il a été montré que la PARP est indirectement impliquée dans la mort cellulaire par apoptose. En effet, la PARP-1 est une cible des caspases, en particulier des caspases 3 et 7, qui clivent l'enzyme en deux fragments et qui l'inactivent. Par conséquent, la PARP ne peut plus assurer la réparation de l'ADN et la cellule entre en apoptose (Sodhi et al., 2010).

➤ Parthanatos

Hormis son rôle dans la mort cellulaire par nécrose et, indirectement par apoptose, des études ont montré que la PARP est impliquée dans un autre type de mort appelé « parthanatos » (voir pour revue Wang et al., 2009). Il s'agit d'une mort caspase-indépendante liée à la translocation du facteur AIF (apoptosis inducing factor) de la mitochondrie vers le noyau. Au cours de l'ischémie cérébrale, il a été montré que les PARs synthétisés par la PARP quittent le noyau et interagissent avec les mitochondries, ce qui entraîne la translocation de AIF de la mitochondrie vers le noyau. AIF induit alors la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire (Fatokun et al., 2014).

b) PARP et inflammation

L'implication de la PARP dans la réaction inflammatoire a été établie il y a presque 20 ans (Weltin et al., 1995) et depuis, un nombre croissant d'études tente d'en préciser les mécanismes moléculaires, en particulier à la suite de l'ischémie cérébrale (voir pour revues : Bai et Virág, 2012; Giansanti et al., 2010; Moroni, 2008; Kauppinen et Swanson, 2007; Erdélyi et al., 2005).

L'inhibition génétique ou pharmacologique de la PARP-1 dans des modèles d'ischémie cérébrale a permis de diminuer la réaction inflammatoire. Il a été montré, notamment dans notre laboratoire, que la PARP-1 participe à l'augmentation de l'expression post-ischémique de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires : (1) des cytokines telles que le TNF et l'IL-6 (Sun et al., 2012; Haddad et al., 2006), (2) des enzymes comme la NOSi et la COX-2 (Sun et al., 2012; Kumaran et al., 2008; Koh et al.,

2004; Park et al., 2004) et (3) des molécules d'adhésion telles que ICAM-1 et la E-sélectine (Sun et al., 2012; Lenzser et al., 2007; Haddad et al., 2006; Koh et al., 2004; Park et al., 2004). De plus, nous avons montré que la PARP est impliquée dans l'infiltration des leucocytes observée au cours de l'ischémie cérébrale (Couturier et al., 2003; Ducrocq et al., 2000) ce qui a ensuite été confirmé par les travaux de Koh et al. (2005).

Il a été démontré que l'effet pro-inflammatoire de la PARP est dû à l'interaction de l'enzyme avec des facteurs de transcription, en particulier AP-1 et NF- κ B, qui régulent l'expression de protéines et de cytokines pro-inflammatoires (Hu et al., 2013; Koh et al., 2005; Chiarugi et Moskowitz, 2003; Hassa et Hottiger, 2002; Hassa et al., 2001).

En revanche, les mécanismes par lesquels la PARP active NF- κ B sont actuellement controversés. Des travaux indiquent que l'activation de NF- κ B par la PARP serait liée à l'activité enzymatique de la PARP (Nakajima et al., 2004; Chiarugi et Moskowitz, 2003), alors que d'autres études montrent que cet effet serait plutôt dû à une interaction directe de la PARP avec NF- κ B, indépendamment de son activité enzymatique et de sa liaison à l'ADN (Ha et al., 2002; Hassa et al., 2001).

Par ailleurs, Ullrich et al. (2001) ont été les premiers à montrer que la PARP-1 joue un rôle dans l'activation et la migration des cellules microgliales, cellules immunitaires du système nerveux et sources importantes de facteurs pro-inflammatoires. Par la suite, d'autres équipes ont confirmé cet effet et ont démontré que l'inhibition de la PARP dans des modèles d'ischémie cérébrale diminue l'activation microgliale (Kauppinen et al., 2009; Hamby et al., 2007; Koh et al., 2004).

IV. PARP, atteintes microvasculaires et dysfonction endothéliale

1. Au cours de l'ischémie cérébrale et de la thromolyse

Des études précliniques ont montré qu'au cours de l'ischémie cérébrale, la PARP est impliquée dans les atteintes microvasculaires, et en particulier dans les altérations endothéliales (Moroni et Chiarugi, 2009). Une étude a ainsi montré que l'administration d'inhibiteurs de PARP chez des animaux ischémiés permet de préserver l'intégrité de la perméabilité de la BHE et de diminuer la dégradation de certains composants des jonctions endothéliales de la BHE (Lenzser et al., 2007). Cet effet pourrait être notamment lié à une réduction de l'expression des MMP (Haddad et al., 2008; Koh et al., 2005). D'autre part, comme nous l'avons détaillé précédemment, l'inhibition de la PARP permet de diminuer l'expression des molécules d'adhésion et l'infiltration leucocytaire post-ischémiques.

L'implication de la PARP dans ces atteintes microvasculaires pourrait expliquer la réduction des transformations hémorragiques spontanées mise en évidence au sein de notre laboratoire dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire chez la souris (Haddad et al., 2008).

Mais que se passe-t-il lors d'une thrombolyse par le rt-PA? La première étude *in vivo* à avoir identifié l'existence d'un lien entre le rt-PA et la PARP est celle de Crome et collaborateurs réalisée en 2007. Cette équipe a démontré que le rt-PA potentialise l'activation de la PARP. En effet, dans un modèle d'ischémie cérébrale réalisée chez la souris, l'administration du rt-PA induit une augmentation importante des PARs 4h après l'ischémie, et l'inhibition de la PARP par le 3-AB réduit cette augmentation. De plus, l'activation de la PARP par le rt-PA impliquerait les récepteurs NMDA puisque le MK-801, antagoniste de ces récepteurs, s'oppose à la synthèse des PARs induite par le rt-PA (Crome et al., 2007).

De manière intéressante, des études réalisées au laboratoire complètent les travaux de Crome et collaborateurs car nous avons montré dans 2 modèles différents d'ischémie que le PJ34 protège la BHE et réduit les TH induites par le rt-PA (Haddad et al., 2013; Teng et al., 2013; El Amki et al., en préparation). De plus, notre équipe a récemment montré que l'administration de PJ34 permet d'améliorer la reperfusion induite par le rt-PA dans un modèle d'ischémie cérébrale thromboembolique (El Amki et al., en préparation).

2. Autres maladies cardiovasculaires

Outre l'ischémie cérébrale, le rôle clé de l'hyperactivation de la PARP-1 dans la dysfonction vasculaire a été particulièrement étudié dans d'autres maladies cardiovasculaires telles que l'ischémie/reperfusion cardiaque, le diabète ou encore l'athérosclérose, aussi bien dans des modèles expérimentaux qu'en clinique (voir pour revue Pacher et Szabó, 2007). Un mécanisme commun à ces situations pathologiques est l'augmentation importante des espèces réactives dérivées de l'oxygène (stress oxydant) et de l'azote (stress nitrant) au niveau de l'endothélium. Ces composés, en particulier les anions peroxy-nitrites, sont à l'origine de cassures de l'ADN et par conséquent d'une hyperactivation de la PARP.

➤ Ischémie/reperfusion myocardique

D'un point de vue préclinique, il a été montré que l'expression de la PARP dans le myocarde est fortement augmentée à la suite d'une ischémie suivie d'une reperfusion ; cette hyperactivation serait impliquée dans la dysfonction vasculaire observée dans cette maladie cardiaque (voir pour revues (Pacher et Szabó, 2007; Szabó, 2005; Szabó et Bährle, 2005). L'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme ou de souris PARP-1^{-/-} a permis de diminuer significativement les lésions induites par

l'ischémie/reperfusion. Cet effet protecteur est également associé à une diminution de l'état inflammatoire du myocarde (diminution de l'infiltration leucocytaire et de l'expression de molécules d'adhésion), à une diminution de la nécrose des cellules endothéliales et des cardiomyocytes, à une amélioration de la contractilité, et enfin, à une amélioration du statut énergétique des cardiomyocytes (Zingarelli et al., 2003; Liaudet et al., 2001; Pieper et al., 2000; Zingarelli et al., 1998, 1997).

A la suite de résultats concluants obtenus lors d'études précliniques, le laboratoire Inotek a mené de 2004 à 2006 un essai clinique de phase II afin d'évaluer l'innocuité de l'INO-1001, puissant inhibiteur de la PARP-1, à la suite d'un infarctus du myocarde et avant une angioplastie coronarienne (<https://clinicaltrials.gov>). Cette étude a permis non seulement de décrire le profil pharmacocinétique du produit, mais également de mettre en évidence sa bonne tolérance chez les patients. Ces résultats encourageants sont donc prometteurs pour d'autres investigations cliniques (Morrow et al., 2009).

➤ **Diabète**

Un certain nombre d'études s'accorde à montrer que l'activation de la PARP au cours du diabète contribue à la pathogenèse de cette maladie, et en particulier au développement de la dysfonction endothéliale et aux complications vasculaires, en clinique comme dans des modèles animaux (voir pour revues Pacher et Szabó, 2005; Virág et Szabó, 2002).

Dans un **modèle expérimental** de diabète de type I, l'activation de la PARP a été mise en évidence et localisée au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses. Cette activation est significative au cours des 2 semaines qui suivent le début du diabète, et elle précède l'apparition de la dysfonction endothéliale qui se développe entre la 2^{ème} et la 4^{ème} semaine de diabète (Garcia Soriano et al., 2001; Soriano et al., 2001).

Garcia Soriano et collaborateurs ont montré *ex vivo* qu'il existe, chez les souris diabétiques, une altération importante des fonctions vasomotrices avec une diminution des capacités de relaxation endothélium dépendante. Le traitement par le PJ34 a permis non seulement de prévenir le développement de la dysfonction endothéliale, mais également de restaurer la fonction d'un endothélium atteint chez des souris diabétiques (Garcia Soriano et al., 2001; Soriano et al., 2001).

Ces résultats ont été confirmés sur des aortes thoraciques isolées : les vaisseaux issus de souris PARP-1^{-/-} sont protégés de la dysfonction endothéliale induite par des quantités élevées de glucose. Parmi les mécanismes évoqués, cette étude a notamment montré que la PARP entraîne une diminution sévère des réserves énergétiques, ainsi que de l'activité de la NOS endothéliale (Garcia Soriano et al., 2001).

Il est important de noter qu'au cours du diabète, l'implication de la PARP dans l'altération de la fonction endothéliale a principalement été mise en évidence au niveau des macrovaisseaux, comme le soulignent les études ci-dessus. Concernant les microvaisseaux, il semblerait que les mécanismes soient similaires. Des études ont en effet montré que la PARP contribue au développement des complications diabétiques qui touchent la microcirculation: les rétinopathies, les néphropathies et les neuropathies (Pacher et Szabó, 2005).

Concernant **les études cliniques**, les travaux de Szabo et collaborateurs réalisés sur des biopsies cutanées ont mis en évidence une augmentation importante de l'activité de la PARP dans les cellules endothéliales des patients diabétiques (diabète de type II) et chez les patients non atteints de la maladie mais ayant des antécédents familiaux de diabète. De plus, il existe une corrélation entre cette activation et l'altération de la réactivité vasculaire au niveau de la microcirculation cutanée (Szabó et al., 2002).

➤ **Athérosclérose**

Des études récentes suggèrent que la PARP-1 est impliquée dans la dysfonction endothéliale observée lors de l'athérosclérose (voir pour revue Xu et al., 2014).

Chez l'homme, des quantités élevées de PARP-1 ont été retrouvées au niveau des plaques d'athérosclérose (Perrotta et al., 2011; Martinet et al., 2002).

L'hyperactivation et le rôle délétère de l'enzyme ont également été confirmés dans **des modèles animaux** d'athérosclérose (souris ApoE^{-/-}). Il a été montré d'une part que la PARP, par son effet pro-inflammatoire mais également par la diminution de l'activité de la NOS endothéliale, participe au processus d'athérogenèse. D'autre part, des études suggèrent que la PARP pourrait être impliquée dans la déstabilisation de la plaque d'athérosclérose, en modifiant notamment la composition de la plaque (voir pour revue Xu et al., 2014).

L'inhibition de la PARP par l'INO-1001 dans un modèle murin d'athérosclérose a permis de protéger l'endothélium puisqu'une amélioration des fonctions vasomotrices endothéliales a été observée (Benkö et al., 2004). Par ailleurs, Von Lukowicz et al. (2008) ont mis en évidence que l'inhibition génétique ou pharmacologique de la PARP-1 par le PJ34 inhibe la formation des plaques d'athérosclérose chez des souris ApoE^{-/-}, *via* notamment une diminution de l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1, E- et P-sélectine. Ces résultats ont été confirmés par Oumouna-Benachour et al. (2007) qui ont montré que l'inhibition de la PARP permet de diminuer le nombre et la taille des plaques d'athérosclérose. L'inhibition de l'enzyme a également permis de stabiliser la plaque d'athérosclérose existante, en diminuant la quantité de cellules spumeuses et la production

de MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), en augmentant la quantité de collagène et en renforçant la chape fibreuse qui est enrichie en cellules musculaires lisses.

Ainsi, l'ensemble de ces études montre que les inhibiteurs de PARP permettent de diminuer la dysfonction vasculaire par la protection de l'endothélium. Mais l'endothélium ne semble pas être la seule cible de cette enzyme puisque d'autres études suggèrent que les inhibiteurs de PARP pourraient également agir sur les plaquettes.

3. PARP, plaquettes et perfusion tissulaire

Jusqu'à présent, peu d'études se sont intéressées à l'effet de l'inhibition de la PARP sur l'activation/agrégation plaquettaire. Néanmoins, Khandoga et al. (2002) ont montré qu'à la suite d'une ischémie/reperfusion hépatique réalisée chez la souris, la délétion du gène de la PARP-1 permet de diminuer significativement l'adhésion des plaquettes dans les microvaisseaux ; cet effet s'accompagne également d'une diminution de l'adhésion leucocytaire et permet d'améliorer la perfusion tissulaire. Dans ce modèle d'ischémie/reperfusion hépatique, le rôle de la PARP dans l'interaction entre les plaquettes et l'endothélium semble être lié à une augmentation de la translocation de la P-sélectine et de l'expression post-ischémique des taux d'ARNm d'ICAM-1.

Deux ans plus tard, cette même équipe a confirmé le rôle de la PARP dans l'agrégation plaquettaire en utilisant cette fois-ci un inhibiteur pharmacologique de l'enzyme : le 5-AIQ (5-aminoisoquinolinone), dans le même modèle d'ischémie/reperfusion hépatique (Khandoga et al., 2004). Ce traitement a permis de diminuer l'adhésion plaquettaire dans la microcirculation et d'améliorer la perfusion du tissu.

Un rôle de la PARP dans l'agrégation des plaquettes a également été retrouvé dans un modèle d'endotoxémie, au niveau des microvaisseaux pulmonaires (Kiefmann et al., 2004).

Ces études suggèrent donc que les mécanismes à l'origine de l'implication de la PARP dans l'adhésion des plaquettes seraient liés à une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion. Néanmoins, d'autres études ont montré que cet effet serait indépendant de l'enzyme. En particulier dans une étude réalisée *in vitro*, Alexy et al. (2004) ont émis l'hypothèse suivante : comme les inhibiteurs de PARP présentent une ressemblance structurelle avec l'ADP (molécule permettant l'agrégation des plaquettes), certains d'entre eux seraient capables d'entrer en compétition avec l'ADP au niveau de ses récepteurs plaquettaires, et de s'opposer à l'agrégation des plaquettes.

Une étude réalisée au laboratoire par le Dr Lechaftois a conforté cette hypothèse en montrant *in vitro* sur du sang humain, que le PJ34 aurait un effet antiagrégant plaquettaire *via* les récepteurs

P2Y₁₂ puisqu'il inhibe l'agrégation induite par l'ADP. En revanche, à partir du plasma de souris, les inhibiteurs de PARP n'ont eu aucun effet sur l'agrégation plaquettaire. La différence observée entre l'homme et la souris pourrait être liée à une différence de structure entre les récepteurs plaquettaires (P2Y₁₂) selon les espèces (Lechaftois et al., sous presse).

Ce chapitre illustre le rôle majeur de la PARP dans la pathogénèse de plusieurs maladies et en particulier des AVCi. La PARP participe notamment aux atteintes vasculaires qui se produisent au cours de l'ischémie cérébrale ; cette enzyme semble même impliquée dans la toxicité vasculaire du rt-PA. Néanmoins, avant de conclure sur l'intérêt d'associer un inhibiteur de PARP au rt-PA chez les patients victimes d'AVCi, il est indispensable de préciser les mécanismes mis en jeu par la PARP qui contribue aux atteintes endothéliales après une thrombolyse par le rt-PA.

BUT DU TRAVAIL

A la suite du traitement d'un AVCi par le rt-PA, les cliniciens sont confrontés à plusieurs problèmes : (1) pour la majorité des patients thrombolysés, le rt-PA n'est que partiellement efficace (recanalisation partielle) voire inefficace (absence de recanalisation), (2) la thrombolyse est suivie dans 20 à 30% des cas d'une réocclusion du vaisseau, (3) le rt-PA multiplie par 6 le risque de survenue des TH post-ischémiques. Comprendre les mécanismes à l'origine de l'inefficacité du rt-PA au travers de ses effets sur l'hémostase et sur l'endothélium vasculaire cérébral, constitue donc un enjeu majeur pour une meilleure prise en charge des AVCi.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été de poursuivre les travaux initiés au laboratoire en précisant par quels mécanismes le rt-PA exerce une toxicité vasculaire, et en recherchant la contribution de la PARP dans ces mécanismes. Pour cela, je me suis intéressée à l'effet du rt-PA et de la PARP dans les phénomènes d'hypoperfusion et de réocclusion évalués par la présence de dépôts de fibrine ; j'ai également recherché le rôle du rt-PA dans l'inflammation post-ischémique en évaluant l'expression de deux marqueurs endothéliaux, VCAM-1 et ICAM-1. Enfin, grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr Boulanger (INSERM-U970, Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire, HEGP), nous nous sommes intéressés à un autre biomarqueur récent de dysfonction endothéliale : les microparticules endothéliales (MPE). Mon travail de thèse a comporté deux volets, l'un *in vivo* et l'autre *in vitro*. *In vivo*, les études ont été réalisées dans un modèle d'ischémie cérébrale qui consiste à injecter de la thrombine dans la lumière de l'artère cérébrale moyenne (ACM) afin de l'occlure. Pour les études *in vitro*, nous avons opté pour une lignée de cellules endothéliales cérébrales murines (bEnd.3).

L'ensemble de ces travaux s'intègre dans l'étude des atteintes vasculaires induites par le rt-PA, avec comme objectif à terme, de proposer une stratégie permettant de pouvoir faire bénéficier un plus grand nombre de patients victimes d'un AVCi d'une thrombolyse plus efficace et plus sûre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

PREMIÈRE PARTIE : EXPÉRIMENTATIONS *IN VIVO*

Toutes les expériences ont été réalisées chez des souris mâles Swiss d'un poids compris entre 27 et 32 g (Janvier, Le Genest Saint Isle, France), en accord avec la Directive du Conseil de la Communauté Européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC) et les réglementations françaises (D2001-486) sur la protection des animaux utilisés en expérimentation. Les protocoles ont été approuvés par le Comité Régional d'éthique pour l'expérimentation animale (P2.CM.152.10).

I. Modèle d'ischémie cérébrale focale par injection de thrombine

Le modèle d'ischémie cérébrale utilisé est un modèle thromboembolique qui consiste à injecter de la thrombine dans la lumière de l'artère cérébrale moyenne (ACM) à l'aide d'une micropipette en verre. Ce modèle induit une occlusion distale de l'ACM et est à l'origine de lésions exclusivement corticales. Il a été élaboré par Orset et al. (2007) et introduit au laboratoire par Bérard Coqueran, technicien, et Mohamad El Amki, doctorant, en 2009.

1. Détermination de l'activité de la thrombine

Au cours de la prise en main de ce modèle, différentes solutions de thrombine ont été utilisées (thrombine α humaine, HCT-0020, Haematologic Technologies Inc., Cryopep, Montpellier, France). La concentration en thrombine de chacune de ces solutions est définie en Unité par μl (UI/ μl). Une unité correspond à la quantité nécessaire de thrombine pour induire un caillot en 10 secondes.

Dès réception des lots, l'activité de la thrombine a été mesurée. La méthode de dosage a été élaborée avec l'aide du Dr Le Bonniec (UMR_S1140 Inserm, Université Paris Descartes), ce qui m'a permis, par la suite, d'introduire cette technique au sein du laboratoire.

La thrombine est mise en présence du substrat chromogène BIOPHEN CS-01(38) (229001, HYPHEN BioMed, Neuilly sur Oise, France). La thrombine hydrolyse ce peptide et libère le groupement paranitroaniline (pNA) dont l'absorbance est mesurée à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre thermostaté à 37°C. La vitesse d'apparition du pNA est donc proportionnelle à l'activité de la thrombine.

La thrombine est ensuite diluée à la concentration souhaitée (0,75, 1,5 ou 1,9 UI/ μl) dans un tampon adapté (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, PEG 6000-0,2% pH 8,0). Ce tampon permet de maintenir la solution de thrombine stable lors de sa conservation à -80°C. De plus, le PEG qui est un agent

d'enrobage, diminue le contact entre la thrombine et les parois de la micropipette en verre afin d'éviter son agrégation.

2. Préparation des micropipettes

Un capillaire en verre (555/5, Hoecht, Sondheim-Rhoen, Allemagne) est fixé sur une étireuse verticale (0811/5166257, GETAA, Munich, Allemagne). Par chauffage intense, cette machine permet d'étirer le capillaire jusqu'à sa rupture afin d'obtenir deux micropipettes ayant chacune une extrémité très effilée d'un diamètre d'environ 20 μm . L'extrémité de chaque micropipette est ensuite coupée manuellement dans le but d'obtenir un biseau permettant son introduction dans l'ACM.

La micropipette reliée par un cathéter (E03403, Merck, Chennevieres Les Louvres, France) à une seringue de 50 ml remplie d'air, est fixée sur le micromanipulateur d'un appareil de stéréotaxie (David Kopf, Roucaire, Courtaboeuf, France) afin de réaliser son remplissage par aspiration avec la solution de thrombine puis l'injection dans l'artère (figure 22.A).

3. Réalisation de l'ischémie cérébrale chez la souris

Les souris sont anesthésiées par voie intrapéritonéale (i.p ; 10 ml/kg) avec un mélange de kétamine (50 mg/kg, 0A3136D, Vétoquinol, Paris, France) et de xylazine (6 mg/kg, KP06J9P, Bayer, Leverkusen, Allemagne). L'ensemble de la chirurgie est réalisé sous une loupe binoculaire (Zeiss S21, Carl Zeiss, Jena, Allemagne).

Une fois anesthésiée, la souris est placée en contention stéréotaxique comme l'illustre la figure 22.B. Une incision de la peau est réalisée entre l'oeil et l'oreille gauches *i.e.* du côté ipsilatéral. Le muscle temporal est ensuite dissocié de l'os du crâne puis une craniectomie est effectuée au niveau de l'ACM à l'aide d'une fraise dentaire (Micro-Méga, Anthogyr, Sallanches, France). Un crochet permet de retirer la dure mère. L'insertion de la micropipette au niveau distal de l'ACM est immédiatement suivie de l'injection de 1 μl de thrombine en 3 à 5 minutes (figure 22.C). Afin de permettre la stabilisation du caillot, la micropipette n'est retirée que 10 minutes après l'injection de la thrombine.

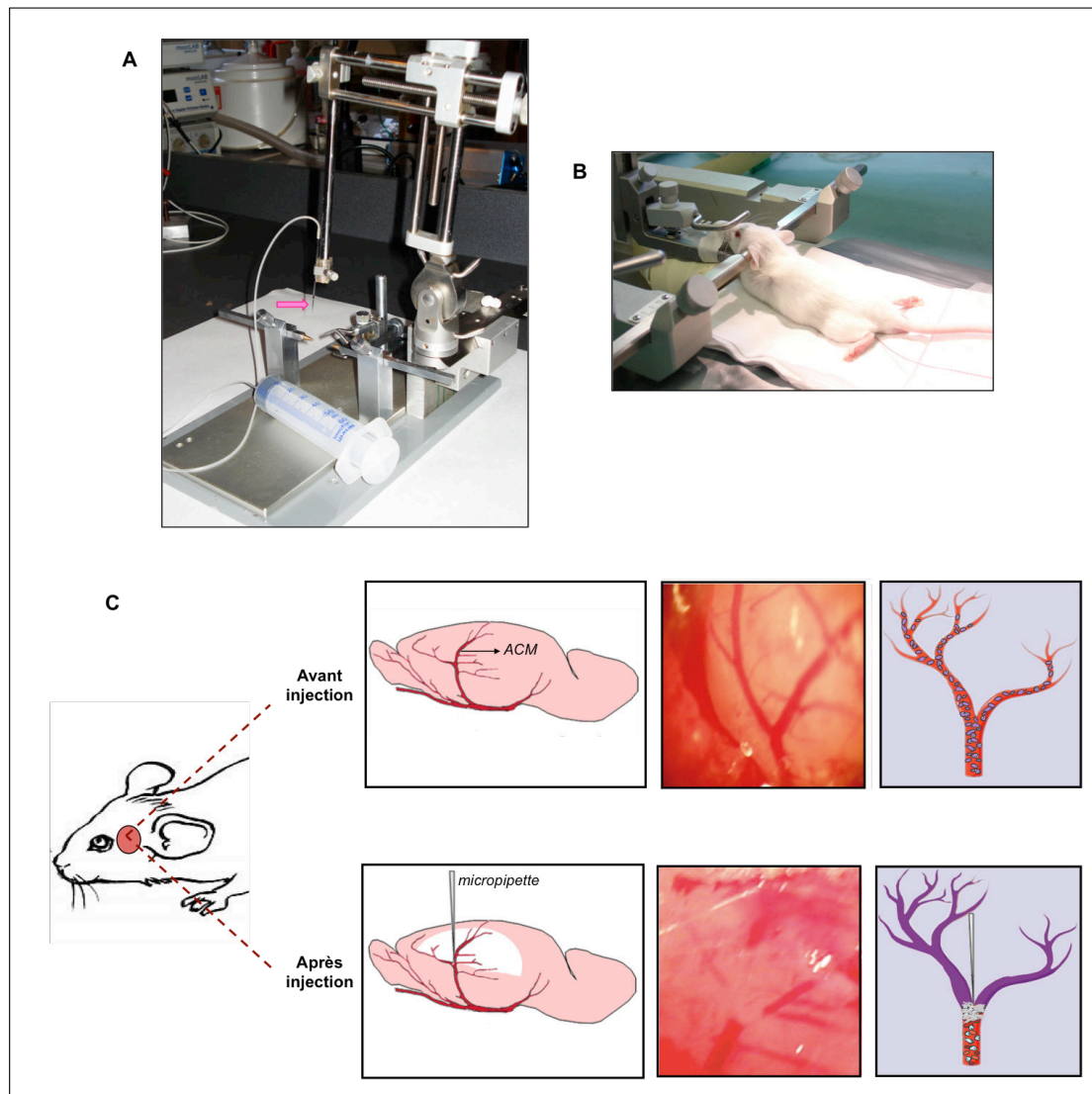


Figure 22 : Modèle d'ischémie cérébrale par injection de thrombine

A : La flèche permet de localiser la micropipette en verre. Cette dernière placée sur le micromanipulateur de l'appareil de stéréotaxie est reliée à une seringue remplie d'air via un cathéter. B : La souris est positionnée en contention stéréotaxique. C : Sous une loupe binoculaire, la bifurcation de l'ACM gauche (ipsilatérale) est identifiée puis la micropipette remplie de thrombine est insérée dans la lumière de l'artère. La thrombine est immédiatement injectée pour former un caillot de fibrine et occlure l'ACM (d'après la thèse du Dr El Amki, 2013). ACM : artère cérébrale moyenne.

L'occlusion de l'ACM est confirmée (1) visuellement en observant sous une loupe binoculaire le caillot se former, (2) par la chute du débit sanguin cérébral (DSC) mesuré à l'aide d'une sonde laser Doppler (IEC 60825-1, Moor instruments, Ltd, Millwey, Royaume-Uni) positionnée dans le territoire de l'ACM situé en aval de la micropipette. Seules les souris ayant une chute du DSC supérieure à 50% pendant au moins 30 minutes sont incluses dans l'étude. En effet, il a été précédemment montré au laboratoire que **les reperfusions spontanées (RS)** précoces se produisent dans les 15 à 30 minutes après l'injection de thrombine (figure 23), et que les souris qui présentent une chute stable du DSC durant 30 minutes maintiennent cette chute pendant au moins 2 heures et développent une lésion corticale.

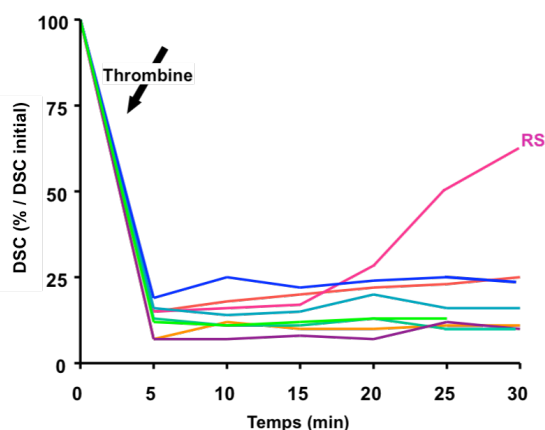


Figure 23 : Suivi du DSC après l'injection de thrombine dans la lumière de l'ACM (n=8)

L'augmentation du DSC dès 15 minutes après l'injection de thrombine signe une RS (reperfusion spontanée) et entraîne l'exclusion de cette souris de l'étude.

Pendant la chirurgie, les souris sont placées sur une couverture chauffante thermostatée reliée à une sonde rectale (Harvard Apparatus, Edenbridge, Kent, Royaume-Uni) afin de maintenir leur température corporelle à $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A l'issue de la chirurgie, les souris sont mises dans une couveuse thermostatée à 30°C avec un libre accès à l'eau et à la nourriture jusqu'à leur euthanasie.

Des souris **témoins non opérées (naïves)**, ainsi que des souris **témoins-opérées**, c'est-à-dire subissant toute les étapes de la chirurgie excepté l'introduction de la micropipette, ont également été incluses dans les études.

II. Protocole d'administration des agents pharmacologiques

Le **rt-PA** (Actilyse®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Allemagne) est commercialisé sous la forme d'une poudre qui est dissoute dans du NaCl à 0,9% en condition d'asepsie (hotte à flux laminaire) afin d'obtenir une solution à 0,2 ou 2 mg/ml. Cette solution est aliquotée et conservée à -40°C afin de préserver l'activité protéasique du rt-PA (Wiernikowski et al., 2000).

Le rt-PA est administré par voie intraveineuse (i.v. ; veine caudale), 4 heures après le début de l'ischémie, ce qui est considéré comme une administration tardive pour le modèle par injection de thrombine, et permet d'étudier l'effet délétère du rt-PA (aggravation des TH post-ischémiques et altération de la BHE) (El Amki et al., 2012 ; El Amki et al., en préparation). Notons que cette administration tardive s'oppose à l'administration précoce, soit 30 minutes après l'ischémie, qui est à l'origine d'effets protecteurs (diminution des volumes de lésion, de l'œdème cérébral et des déficits locomoteurs) (El Amki et al., 2012; Orset et al., 2007).

Par ailleurs, depuis qu'une étude *in vitro* a montré que la fibrinolyse par le t-PA est 10 fois moins efficace chez le rat que chez l'homme (Korninger et Collen, 1981), la dose de 10 mg/kg est couramment utilisée en recherche préclinique, contre 0,9 mg/kg en clinique. Néanmoins, les travaux de Haelewyn et al. (2010) puis ceux réalisés au laboratoire par El Amki et al. (2012), ont montré qu'à la suite de l'ischémie chez le rat et la souris respectivement, la dose de 0,9 mg/kg induit des effets similaires à ceux obtenus avec 10 mg/kg. Par conséquent, au cours de mes travaux de recherche, j'ai testé la dose de 10 mg/kg et/ou la dose 0,9 mg/kg selon les études (figure 24).

Les souris témoins-opérées et ischémisées ont reçu le solvant du rt-PA (NaCl, 0,9%) selon le même protocole.

Le mode d'administration a été établi pour mimer les conditions d'administration du thrombolytique en clinique : 10% de la dose est administrée en bolus pendant 22 secondes, puis 90% de la dose en perfusion pendant environ 30 minutes (durée adaptée au poids de la souris).

L'inhibiteur de PARP le **PJ34** (3 mg/kg), ou son solvant (NaCl, 0,9%) est administré par voie i.p. (10 ml/kg) selon deux protocoles d'administration (figure 24) :

- 2 injections : la première, immédiatement après le début de l'ischémie et la seconde, 3 heures après,
- 1 seule injection : 3 heures après le début de l'ischémie.

Ces protocoles d'administration élaborés au laboratoire par le Dr El Amki ont permis de mettre en évidence l'effet protecteur du PJ34 vis-à-vis des TH induites par le rt-PA (El Amki et al., en préparation).

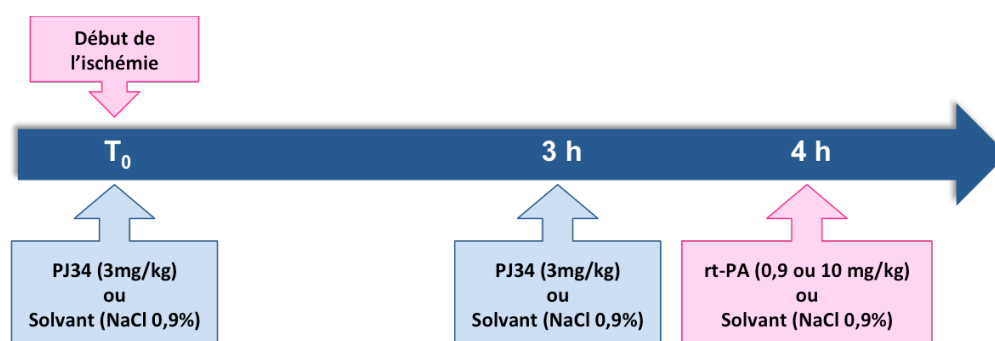


Figure 24 : Protocole d'administration des agents pharmacologiques

III. Exsanguinoperfusion des animaux

Pour l'ensemble des études d'immunohistochimie et pour certaines mises au point du dosage des MPE, une étape d'exsanguinoperfusion a été réalisée avant le prélèvement des cerveaux des souris. Cette étape consiste à perfuser les animaux avec une solution de NaCl 0,9% héparinée par voie intracardiaque afin d'éliminer le sang circulant contenu dans les vaisseaux cérébraux.

La souris est anesthésiée par injection de pentobarbital disodique (Ceva Santé Animale, Libourne, France) dilué au 1/5 dans du NaCl 0,9% (injection i.p. ; 60 mg/kg). Une incision est réalisée au niveau de l'abdomen puis du diaphragme afin d'insérer une aiguille dans l'apex du ventricule gauche de l'animal. Cette aiguille est reliée à une bouteille contenant une solution de NaCl 0,9% héparinée (Héparine Choay® ; 50 UI/ml ; Sanofi Synthelabo, Le Plessis Robinson, France). Dès que la perfusion intracardiaque est débutée, l'oreillette droite est immédiatement incisée pour permettre au sang de s'évacuer hors du corps de l'animal. La perfusion est maintenue pendant 5 minutes à une pression de 100 mmHg, qui correspond à une pression proche de la pression sanguine physiologique. A l'issue de la perfusion, le dispositif est retiré et le cerveau prélevé.

IV. Évaluation des volumes de lésion cérébrale

Deux techniques de coloration ont été utilisées pour visualiser les lésions cérébrales 24 heures après l'ischémie : le chlorure de triphényltétrazolium (TTC) et le violet de crésyl.

1. Coloration de la lésion par le TTC

Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale et les cerveaux sont prélevés. Sept coupes coronales de 1 mm d'épaisseur sont ensuite réalisées à l'aide d'un chopper (Mickle Laboratory Engineering, Gomshall Surrey, Royaume-Uni) (figure 25.A). Ces coupes sont alors immergées dans une solution de TTC-2% (T-8877, Sigma, St Quentin Fallavier, France) pendant 10 minutes à température ambiante.

→ Le TTC est un produit incolore qui devient rouge lorsqu'il est réduit en formazan par les déshydrogénases mitochondriales. Ainsi, les zones cérébrales encore saines et fonctionnelles sont colorées en rouge/rosé tandis que les zones lésées restent blanches (Figure 25.B).

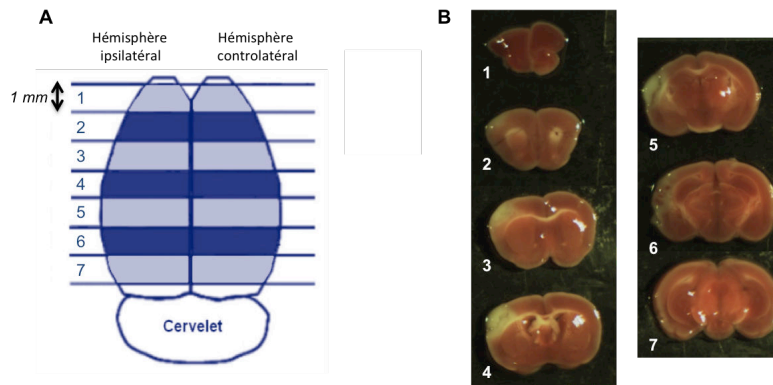


Figure 25 : Coloration de la lésion cérébrale par le TTC 24 heures après l'ischémie

A : Sept coupes coronales de 1 mm d'épaisseur ont été réalisées. B : Après coloration par le TTC, le tissu sain apparaît rouge/rosé et la zone lésée est blanche.

2. Coloration de la lésion par le violet de crésyl

Les souris sont exsanguinoperfusées comme décrit précédemment et euthanasiées. Leurs cerveaux sont prélevés et immédiatement plongés dans une solution d'isopentane à -40°C , puis conservés à cette même température jusqu'à leur utilisation. Treize coupes coronales de $20\ \mu\text{m}$ d'épaisseur sont réalisées tous les $500\ \mu\text{m}$ du niveau d'antériorité $+2,68$ jusqu'au niveau $-3,28$ par rapport au bregma à l'aide d'un cryostat (Jung CM 3000, Leica Microsystems, Nanterre, France) maintenu à environ -17°C (figure 26.A). Les lames sont conservées à -20°C jusqu'au jour de leur utilisation.

→ Le violet de crésyl est un colorant basique qui présente une forte affinité pour les corps de Nissl localisés dans les neurones. Ainsi, cette coloration permet de distinguer les régions saines qui apparaissent en violet du tissu nécrosé qui reste blanc (figure 26.B).

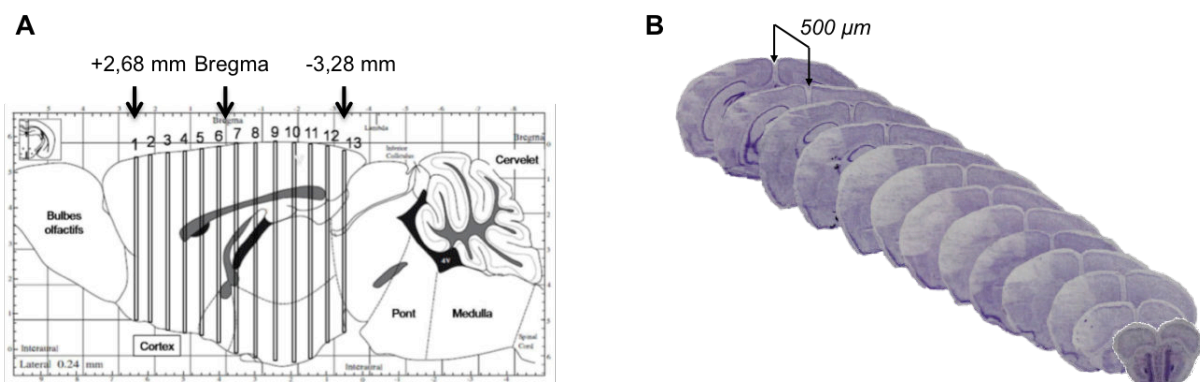


Figure 26 : Coloration de la lésion cérébrale par le violet de crésyl 24 heures après l'ischémie

A : Représentation des 13 niveaux de coupes coronales ($20\ \mu\text{m}$ d'épaisseur) réalisées au cryostat (d'après l'atlas de Franklin et Paxinos, 2001). B : Après coloration par le violet de crésyl, le tissu sain apparaît violet et la zone lésée blanche.

La réalisation de la coloration au violet de crésyl consiste à plonger les lames sur lesquelles les coupes de cerveaux ont été prélevées dans une succession de bains comme décrits ci-dessous :

Bain	Durée
Solution de Carnoy	5 minutes
Solution de violet de crésyl	4 minutes
Eau distillée	1 passage dans 2 bains successifs
Éthanol à 70°	1 passage
Éthanol à 95°	1 passage
Éthanol absolu	1 passage
Toluène	Jusqu'au montage

Le montage des lames est ensuite réalisé en déposant quelques gouttes d'une solution d'Eukitt® (Quick-hardening mounting medium, Fisher, Strasbourg, France) entre la lame et la lamelle.

3. Quantification du volume de lésion cérébrale

Les coupes de cerveaux sont photographiées à l'aide d'une caméra (Motic Imageo Plus 2.0.10, Motic China Group Co, Ltd, Guangzhou, Chine). La surface de la lésion corticale de chaque niveau est ensuite mesurée grâce au logiciel ImageJ (version 1.47, NIH, Bethesda, USA). Chaque surface de lésion est alors corrigée par le rapport (surface du cortex droit / surface du cortex gauche) pour tenir compte de l'œdème cortical induit par l'ischémie. Le volume de la lésion est ensuite calculé en multipliant les surfaces corrigées par la distance séparant les niveaux de coupe et est exprimé en mm³.

V. Évaluation de la présence de fibrine et de l'expression des molécules d'adhésion

1. Western blot

a) Prélèvement et préparation des échantillons

➤ Étude des dépôts de fibrine

Immédiatement après l'euthanasie des souris, les cerveaux sont prélevés puis 7 coupes coronales de 1 mm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un chopper (Mickle Laboratory Engineering, Gomshall Surrey, Royaume-Uni). Le cortex des coupes de l'hémisphère ischémié (ipsilatéral) est prélevé. Les coupes 3-4-5 (région b) qui correspondent au cœur de la lésion sont alors rassemblées, ainsi que les

coupes 1-2 (région a) et 6-7 (région c) en périphérie de la lésion (figure 27). Les échantillons sont immédiatement congelés à -40°C jusqu'au jour de leur broyage.

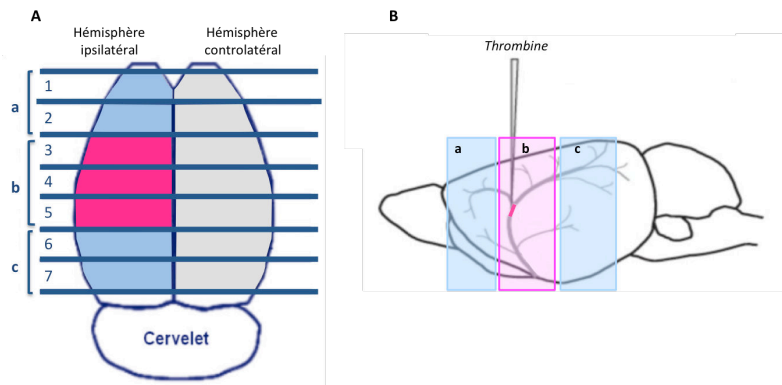


Figure 27 : Prélèvement des échantillons pour l'étude des dépôts de fibrine par Western blot

A : Schéma des 7 coupes coronales de 1 mm d'épaisseur réalisées au chopper (vue supérieure). B : Localisation des régions a, b et c sur un schéma de cerveau en position sagittale.

Les échantillons sont homogénéisés à froid à l'aide d'un potter électrique à embout conique dans environ 10 fois leur volume soit 380 μl de tampon de broyage préparé extemporanément (héparine 10 UI/ml - acide ϵ -aminocaproïque 0,1 M - EDTA trisodique 5 mM - aprotinine 20 μM - phénylméthylsulfonyl fluoride 2 mM - tampon PBS). Les homogénats sont ensuite agités par rotation pendant 14 heures à 4°C . Les échantillons sont alors centrifugés (10 000g, 10 minutes, 4°C) et les culots sont resuspendus dans 380 μl du tampon précédent dépourvu de phénylméthylsulfonyl fluoride, puis de nouveau centrifugés (10 000g, 10 minutes, 4°C). Les nouveaux culots sont resuspendus dans 380 μl d'urée (solution d'urée à 3 ou 6 M selon les études) puis agités pendant 2 heures dans un bain-marie thermostaté à 37°C . Les échantillons sont fortement vortexés puis centrifugés à 14 000g à 4°C pendant 15 minutes. Les culots sont ensuite vigoureusement resuspendus dans 100 ou 200 μl de tampon de Laemmli en conditions réductrices (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 - glycérol 10% - β -mercaptoéthanol 5% - SDS 4%), puis chauffés à 65°C pendant 10 minutes ou à 90°C pendant 15 minutes selon les expériences. Les échantillons sont de nouveau fortement vortexés et une partie est prélevée afin de réaliser le dosage des protéines par la méthode EZQ[®] (voir paragraphe V.1.b). Le reste des échantillons est conservé à -40°C jusqu'à la réalisation du Western blot de fibrine (voir paragraphe V.1.c).

➤ Étude des molécules d'adhésion : VCAM-1 et ICAM-1

L'évaluation de l'expression des molécules d'adhésion, VCAM-1 et ICAM-1, a été réalisée par Western blot sur les mêmes échantillons.

Immédiatement après l'euthanasie des animaux, les cerveaux des souris sont prélevés. A l'aide d'un chopper (Mickle Laboratory Engineering, Gomshall Surrey, Royaume-Uni), 7 coupes coronales de 1 mm d'épaisseur sont réalisées. Le cortex des coupes 3, 4 et 5 de l'hémisphère ischémié (ipsilatéral) est prélevé. Ces 3 coupes représentent la région b, cœur de la lésion (figure 28). Les échantillons sont alors immédiatement congelés à -40°C jusqu'au jour de leur broyage.

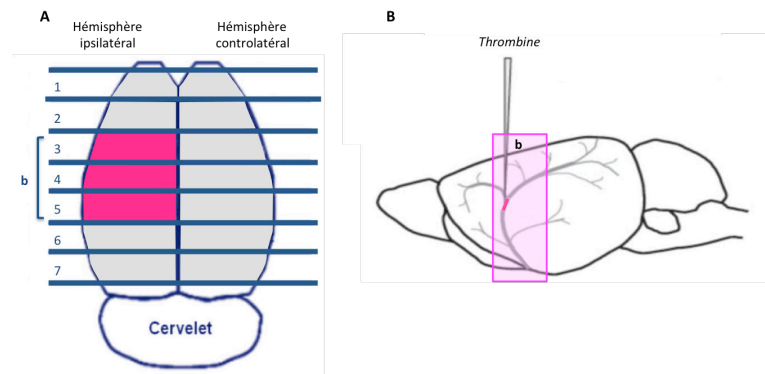


Figure 28 : Prélèvement des échantillons pour l'étude de VCAM-1 et ICAM-1 par Western blot

A : Schéma des 7 coupes coronales de 1 mm d'épaisseur réalisées au chopper (vue supérieure). B : Localisation de la région b sur un schéma de cerveau en position sagittale.

Le jour du broyage, une pastille d'inhibiteurs de protéases « Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets » (04693124001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) est ajoutée dans 10 ml de tampon de broyage (Tris-HCl 50 mM - NaCl 150 mM- Triton X-100 1% ; pH 7,4). Les échantillons sont alors broyés à froid dans 10 fois leur volume de ce tampon de broyage (environ 400 μl /échantillon) à l'aide d'un ultra-turrax (Ultra-turrax[®] T8, IKA, Staufen, Allemagne), puis passés au sonicateur (2x5 secondes). Les homogénats sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 12 000g à 4°C . Une partie du surnageant est prélevée pour doser les protéines par la méthode BCA (voir paragraphe V.1.b) ; le reste de surnageant est dilué au 1/2 dans du tampon de Laemmli en conditions réductrices (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 - glycérol 10% - β -mercaptoéthanol 5% - SDS 4%). Chaque échantillon est alors chauffé à 95°C pendant 10 minutes puis conservé à -40°C jusqu'au jour du Western blot d'ICAM-1 et de VCAM-1 (voir paragraphe V.1.c).

b) Dosage des protéines

➤ **Méthode EZQ[®]**

Le dosage des protéines est réalisé par fluorescence à l'aide du réactif contenu dans le kit « EZQ[®] Protein Quantitation » (R33200, Molecular Probes, Interchim, Clichy, France). Une gamme étalon comprise entre 0 et 1,5 mg/ml est réalisée à partir d'une solution d'ovalbumine fournie dans ce kit et diluée dans du tampon de Laemmli.

Les échantillons, ainsi que chaque point de gamme sont déposés en triplicata (1 µl par dépôt) sur une feuille de papier (fournie par le fabricant du kit) positionnée sur une plaque 96 puits. La membrane est ensuite séchée et incubée dans du méthanol (40 ml/membrane) pendant 5 minutes sous agitation, ce qui correspond à l'étape de fixation des protéines. Après avoir de nouveau séché la membrane, cette dernière est mise en présence du réactif EZQ® (40ml/membrane) pendant 30 minutes sous agitation et à l'abri de la lumière. Les membranes sont rincées 3 fois 2 minutes avec un mélange acide acétique 7% - méthanol 10%. A l'aide d'un fluorimètre, la fluorescence est alors mesurée (excitation : 440 nm, émission : 620 nm) et est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans les échantillons.

➤ **Méthode BCA**

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode BCA (acide bicinchoninique) à l'aide du kit « bicinchoninic Acid Protein Assay » (BCA1, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Le principe de ce dosage repose sur la formation d'un complexe protéine-Cu²⁺ en condition alcaline, suivie d'une réduction du Cu²⁺ en Cu⁺. L'ion Cu⁺, en formant un complexe violet avec le BCA, est détecté par colorimétrie. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon.

Une gamme étalon est réalisée à partir d'albumine sérique bovine (A3059, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) comprise entre 0,1 et 1,5 mg/ml. Cette gamme ainsi que les échantillons à doser sont déposés en duplicata sur une microplaque 96 puits à raison de 25 µl par puits. Un volume de 200 µl d'un tampon de travail est ajouté dans chaque puits. Ce tampon de travail a été préalablement obtenu en mélangeant le réactif A du kit (solution alcaline d'acide bicinchoninique ; B9643, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) avec le réactif B (solution de sulfate de cuivre(II) ; C2284, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) dans un rapport de 50 :1. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, l'absorbance à 562 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECTROstar^{Nano}, BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France).

c) Réalisation du Western blot

La technique de Western blot consiste à séparer les protéines de l'échantillon par électrophorèse selon leur masse moléculaire puis à révéler la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps (AC) spécifique.

➤ **Electrophorèse**

Sur un gel de concentration en polyacrylamide à 4,15%, les échantillons sont déposés en quantité constante de protéines (voir tableau 5), au même titre qu'un marqueur de masse moléculaire (5 µl/puits ; RPN800E, Full-Range rainbow, Amersham, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France).

La migration des échantillons à travers le gel de concentration sous courant constant (25 mA/gel) et en présence de tampon d'électrophorèse (Tris 25 mM – glycine 192 mM – SDS 0,1%) permet de concentrer les protéines afin qu'elles pénètrent simultanément dans un gel de migration, lui-même en polyacrylamide à 10 ou 7,5% (voir tableau 5). Une fois dans le gel de migration, les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire.

➤ **Electrotransfert**

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PDVF ; porosité 0,45 µm ; membrane préalablement activée dans de l'éthanol absolu) pendant 1 heure à 100 Volts dans un tampon de transfert (Tris 500 mM - glycine 384 mM - 20% d'éthanol).

➤ **Blocage des sites non spécifiques et immunomarquage**

Les membranes sont incubées pendant 1 heure à température ambiante sous agitation dans une solution de T-TBS à 0,1% (Tris 10 mM - NaCl 142 mM - pH 7,6 - 0,1% de Tween 20) contenant 5% de lait afin de bloquer les sites non spécifiques. Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C en présence de l'AC primaire dilué dans la solution de blocage (voir tableau 5). Après 3 lavages (1x15 minutes puis 2x5 minutes) dans du tampon T-TBS à 0,1%, les membranes sont mises en présence d'un AC secondaire dilué dans la solution de blocage pendant 1 heure sous agitation, à température ambiante et à l'abri de la lumière (voir tableau 5). Trois lavages sont ensuite réalisés (1x15 minutes et 2x5 minutes) dans du tampon T-TBS à 0,1%.

➤ **Révélation**

▪ **Révélation par chimioluminescence (ECL)**

Le système de révélation Enhanced Chimio Luminescence (ECL) select consiste à ajouter sur chaque membrane pendant environ 5 minutes, 1 ml de substrat ECL Prime (RPN2232, Amersham, GE-Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) qui contient du luminol, le substrat de l'enzyme HRP (horseRadish Peroxidase) couplée à l'AC secondaire.

L'action de l'HRP sur le luminol entraîne une émission de lumière qui est impressionnée sur des films radiographiques (Z373508, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) dans une chambre noire.

▪ **Révélation par chimiofluorescence (ECF)**

Cette technique de révélation nécessite une amplification du signal *via* la fixation d'un AC tertiaire anti-fluorescéine couplé à la phosphatase alcaline (RPN5781 du Kit ECF, Amersham, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) dilué au 1/2000^{ème} dans la solution de blocage. Après 1 heure d'incubation sous agitation, à température ambiante et à l'obscurité, les membranes sont lavées dans du tampon T-TBS à 0,1%.

La révélation est réalisée par l'ajout sur chaque membrane de 1 ml de substrat pour la phosphatase alcaline « Enhanced Chimio Fluorescence » (ECF ; RPN5789 du kit ECF, Amersham, GE-Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Après 20 minutes d'incubation à l'abri de la lumière, les membranes sont scannées à l'aide du Storm 860 (lecture en fluorescence bleue ; GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Une semi-quantification est réalisée avec le logiciel ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics, Foster City, California, USA). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (UA) après soustraction du bruit de fond correspondant à une zone de la membrane sans dépôt. Pour tenir compte des différences induites au cours de l'électrotransfert entre les membranes, 3 points communs sont déposés sur chaque membrane et un facteur de correction est calculé.

Tableau 5 : CONDITIONS EXPÉRIMENTALES UTILISÉES AU COURS DES WESTERN BLOT					
Protéine d'intérêt	Quantité de protéines / puits (µg)	Gel de migration	AC primaire	AC secondaire	Technique de révélation
Fibrine	5 10 15	7,5% 10%	AC de lapin anti-fibrin(ogène) (A0080, Dako) Dilution: 1/2 000; 1/4 000; 1/8 000; 1/12 000	AC anti-IgG de lapin, couplé HRP (NA934, Amersham) Dilution: 1/50 000	ECL
				AC anti-IgG de lapin, couplé FITC (N1034, Amersham) Dilution: 1/1 000	ECF
VCAM-1	40	7,5%	AC de lapin anti-VCAM-1 (sc-8304, Santa Cruz) Dilution: 1/1 000 AC de lapin anti-VCAM-1 (EPR5047, Abcam) Dilution: 1/1 000	AC anti-IgG de lapin, couplé FITC (N1034, Amersham) Dilution: 1/1 000	ECF
ICAM-1	40	7,5%	AC de lapin anti-ICAM-1 (sc-1511-R, Santa Cruz) Dilution: 1/500 AC de lapin anti-ICAM-1 (ab124759, Abcam) Dilution: 1/600	AC anti-IgG de lapin, couplé FITC (N1034, Amersham) Dilution: 1/1 000	ECF
			AC de chèvre anti-ICAM-1 (AF796, R&D Systems) Dilution: 1/2 000	AC anti-IgG de chèvre, couplé FITC (31533, Pierce) Dilution: 1/200	
Actine	40	7,5%	AC de lapin anti-actine (A-2066, Sigma) Dilution: 1/10 000	AC anti-IgG de lapin, couplé FITC (N1034, Amersham) Dilution: 1/1 000	ECF

d) Remarques

➤ **Préparation des témoins positifs**

▪ **Témoin positif pour le Western blot de la fibrine**

Du fibrinogène a été utilisé comme contrôle positif lors de la mise au point du Western blot de fibrine. Le fibrinogène a été purifié à partir d'échantillons de sang humain par le Dr Le Bonniec (UMR_S1140 Inserm, Université Paris Descartes), puis a été dilué dans du tampon de Laemmli avant d'être utilisé en Western blot. Différentes quantités de fibrinogène ont été déposées dans les gels, de 2,5 ng à 0,1 µg selon les études.

▪ **Témoin positif pour le Western blot d'ICAM-1**

Des cellules Raw 264.7 (sc-2211, Santa Cruz biotechnology, Heidelberg, Allemagne) diluées dans du tampon de Laemmli ont été utilisées comme contrôle positif lors de la mise au point du Western blot d'ICAM-1 (quantité déposée : 25 µg/puits). Il s'agit d'un lysat cellulaire provenant d'une lignée murine de macrophages, couramment utilisé comme témoin positif pour des marqueurs d'inflammation.

➤ **Utilisation d'un peptide bloquant lors du Western blot d'ICAM-1**

Afin de s'assurer de la spécificité des signaux observés grâce à l'AC anti-ICAM-1 de chez Santa Cruz (sc-1511-R), nous avons utilisé son peptide bloquant (ICAM-1 (M-19) P, sc-1511 P, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne). La concentration du peptide bloquant (2 µg/ml) est définie selon les recommandations du fournisseur : ce dernier doit être en excès par rapport à l'AC anti-ICAM-1, c'est-à-dire en quantité 5 fois supérieure.

Les membranes sont incubées avec l'AC seul ou avec l'AC en présence de peptide bloquant. La structure du peptide correspond à l'épitope reconnu par l'AC anti-ICAM-1. Ainsi, le peptide présent en excès se lie à l'AC qui ne peut donc plus se fixer sur sa protéine cible. Par conséquent, les signaux spécifiques correspondent aux bandes détectées après incubation des membranes avec l'AC anti-ICAM-1 et qui disparaissent en présence du peptide neutralisant.

2. Immunohistochimie (IHC)

Les souris sont exsanguinoperfusées et les cerveaux sont prélevés puis préparés selon les mêmes conditions que lors de la coloration par le violet de crésyl (voir paragraphe IV.2).

a) Réalisation de l'IHC

➤ **Étude de l'expression de la fibrine et de VCAM-1 : révélation par la DAB**

Le principe de cet immunomarquage repose sur la fixation d'un AC primaire qui reconnaît spécifiquement la molécule d'intérêt. Cette étape est suivie de la fixation sur cet AC d'un AC secondaire couplé à la biotine. Une étape d'amplification du signal est alors réalisée en ajoutant des complexes streptavidine-peroxydases qui se lient à la biotine. Ces complexes dégradent le peroxyde d'hydrogène et libèrent de l'oxygène qui entraîne à son tour l'oxydation de la DAB (3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride) à l'origine d'une coloration brune détectable et quantifiable.

Les coupes de cerveaux sont fixées à l'aide d'une solution d'acétone à 4°C pendant 10 minutes. Après séchage, les lames sont placées dans une chambre humide et les coupes sont réhydratées grâce à une solution de PBS (3x5 minutes). Afin d'inactiver les peroxydases endogènes, les lames sont mises en présence d'une solution de peroxyde d'hydrogène (PBS - 0,3% d'H₂O₂ - 3% de méthanol) pendant 10 minutes sous agitation. Après 3 lavages de 10 minutes avec une solution de PBS, les lames sont incubées dans la chambre humide entre 30 et 45 minutes en présence d'une solution de blocage (tableau 6). Cette étape permet de bloquer les sites non spécifiques avant l'incubation pendant une nuit à 4°C avec l'AC primaire dilué dans cette même solution de blocage (tableau 6). A l'issue de cette incubation, 3 lavages sont réalisés (3x10 minutes) avec une solution de PBS puis les coupes sont mises en contact avec l'AC secondaire dilué dans la solution de blocage durant 2 heures à température ambiante dans la chambre humide (tableau 6). Les lames sont lavées 3 fois 10 minutes avec une solution de PBS. Les coupes sont ensuite incubées 30 minutes à température ambiante avec la solution contenant les complexes streptavidine-peroxydase (PK-6100, VECTASTAIN® Elite ABC kit, Vector Laboratories, Peterborough, Angleterre). Après 3 lavages de 10 minutes, les coupes sont mises en présence d'une solution filtrée de DAB (D5905, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) entre 3 et 5 minutes. Deux lavages de 5 minutes dans de l'eau distillée sont effectués. Les lames peuvent alors être successivement plongées dans des bains d'éthanol à 70°, 90° et 100° puis dans un bain de toluène jusqu'à leur montage à l'Eukitt® (Quick-hardening mounting medium, Fisher, Strasbourg, France). Les coupes de cerveaux sont observées au microscope (Axioskop Zeiss, Gottingen, Allemagne) pour réaliser la quantification du marquage.

Tableau 6 : CONDITIONS EXPÉRIMENTALES UTILISÉES LORS DES IMMUNOHISTOCHIMIES			
Molécule d'intérêt	Solution de blocage	AC primaire	AC secondaire
Fibrine	PBS – 5% de sérum d'âne (D9663, Sigma)	AC de lapin anti-fibrin(ogène) (ab34269, Abcam) Dilution: 1/500	AC biotinylé d'âne anti-lapin (RPN1004, Amersham) Dilution: 1/400
VCAM-1	PBS – 5% de sérum de chèvre (G9023, Sigma)	AC de rat anti-VCAM-1 (MCA2297, Serotec) Dilution: 1/200	AC biotinylé de chèvre anti-rat (STAR131B, Serotec) Dilution: 1/400

Notons que lors des mises au point des marquages, des témoins négatifs (c'est-à-dire des coupes de cerveaux subissant toutes les étapes du protocole excepté l'incubation avec l'AC primaire) ont été réalisés afin de s'assurer de la spécificité des marquages obtenus.

➤ **Étude de l'expression d'ICAM-1 : révélation par immunofluorescence**

Les coupes de cerveaux sont fixées dans un bain d'acétone à 4°C pendant 10 minutes. Les lames sont ensuite séchées et placées dans une chambre humide. Les coupes sont alors réhydratées grâce à une solution de PBS durant 10 minutes. Selon les expériences, une étape de blocage des sites non spécifiques peut être effectuée en incubant pendant 30 minutes les lames avec une solution de PBS contenant 5% de sérum d'âne (tableau 7). Les lames sont alors mises en présence de l'AC anti-ICAM-1 dilué dans la solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante dans la chambre humide (tableau 7). A l'issue de cette incubation, 3 lavages de 10 minutes sont réalisés sous agitation. Les coupes sont incubées en présence de l'AC secondaire pendant 2 heures à température ambiante dans la chambre humide et à l'abri de la lumière. Cet AC a été préalablement dilué dans la solution de blocage (tableau 7). Après 3 lavages de 10 minutes chacun avec du PBS, le montage des lames est réalisé à l'obscurité à l'aide d'une solution de Mowiol 4-88 (81381, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

Afin de quantifier le marquage obtenu, les lames sont scannées à l'aide d'un scanner à fluorescence (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Massy, France) à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM) au sein de l'Hôpital Pitié Salpêtrière, et les images sont exportées grâce au logiciel NDP.view (NanoZoomer Digital Pathology, version 2.3.0).

Tableau 7 : CONDITIONS EXPÉRIMENTALES UTILISÉES LORS DES IMMUNOFLUORESCENCES			
Molécule d'intérêt	Solution de blocage	AC primaire	AC secondaire
ICAM-1	<p>PBS – 5% de sérum de d'âne (D9663, Sigma)</p> <p>ou</p> <p>Sans étape de blocage (incubation avec le tampon PBS)</p>	<p>AC de chèvre anti-ICAM-1 (AF796, R&D Systems)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Dilution: 1/50 ▪ Dilution: 1/100 	<p>AC d'âne anti-chèvre couplé Alexa Fluor 488 (vert) (ab150133, Abcam)</p> <p>Dilution: 1/400</p>

Notons que, comme précédemment, des témoins négatifs (*i.e.* sans AC primaire) ont permis de montrer la spécificité des marquages obtenus.

b) Quantification des immunomarquages

A l'aide du logiciel d'analyse ImageJ (version 1.47, NIH, Bethesda, USA), la quantification des marquages de VCAM-1 et d'ICAM-1 est réalisée sur les coupes 2-4-6-8-10-12 (figure 29.A), avec 2 régions d'intérêt par coupe. Le modèle d'ischémie par injection de thrombine étant à l'origine d'une lésion uniquement corticale, ces régions sont situées au niveau du cortex cérébral ipsilatéral, avec une région localisée au cœur de la zone infarctée et une seconde région en bordure (figure 29.B). Si des zones présentent une forte accumulation de DAB ou de fluorescence au niveau de structure non vasculaire (artefacts), elles sont alors exclues des régions d'intérêts. Un seuil de quantification est ensuite défini afin d'éliminer le bruit de fond et de ne détecter que le marquage spécifique. Enfin, le logiciel permet d'obtenir la surface totale de marquage dans chaque région d'intérêt, exprimée en pixels pour VCAM-1 et en μm^2 pour ICAM-1.

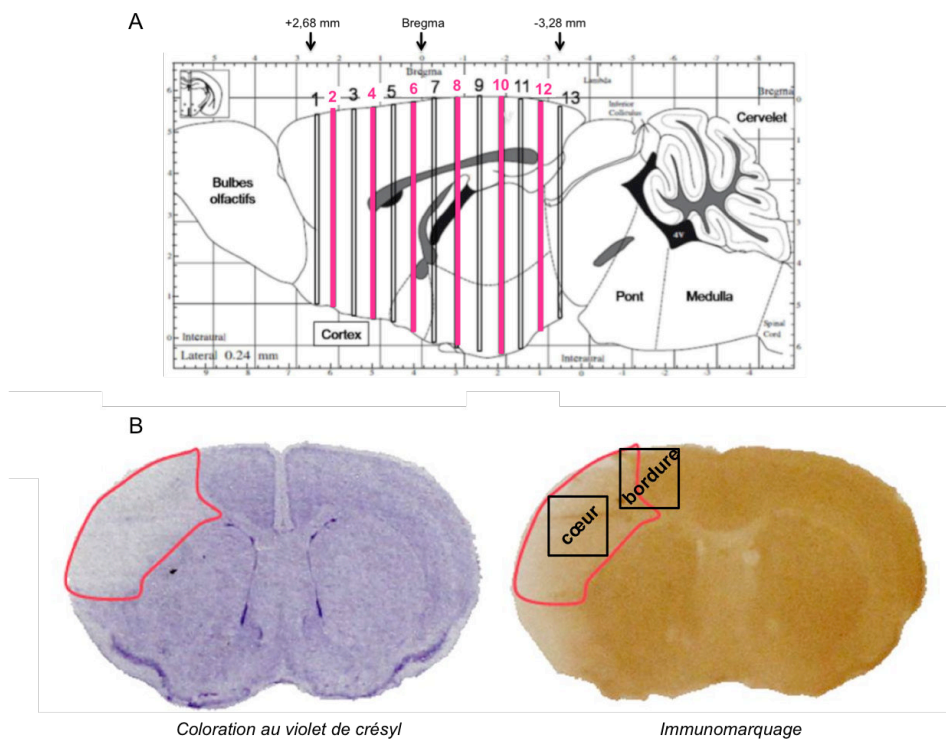


Figure 29 : Quantification des immunomarquages

A : Représentation des 13 niveaux de coupes coronales de cerveaux ($20\ \mu\text{m}$ d'épaisseur) réalisées au cryostat (d'après l'atlas de Franklin et Paxinos, 2001). Les niveaux 2-4-6-8-10-12 ont été utilisés pour la quantification des marquages après IHC. B : La coloration des coupes par le violet de crésyl a permis de mettre en évidence la lésion corticale et de définir 2 régions d'intérêt (région « cœur » et région « bordure ») pour la quantification des immunomarquages.

VI. Détection des microparticules

Les MPs ont été recherchées soit à partir du plasma des souris, soit dans le parenchyme cérébral des animaux.

1. Prélèvement des échantillons

a) Prélèvement de sang et préparation du plasma

➤ Prélèvement par voie intracardiaque

La souris est anesthésiée par une injection i.p. de pentobarbital disodique dilué au 1/5 dans du NaCl 0,9% (60 mg/kg ; Ceva Santé Animale, Libourne, France), puis placée en décubitus dorsal. La paroi abdominale et la cage thoracique sont incisées pour rendre le cœur accessible. A l'aide d'une seringue et d'une aiguille préalablement citratées, 630 µl de sang sont prélevés très doucement au niveau du ventricule droit. L'échantillon de sang est immédiatement déposé dans un tube Eppendorf contenant 70 µl d'une solution de citrate de sodium (0,130 M). Les échantillons doivent ensuite être centrifugés dans les 2 heures qui suivent le prélèvement sanguin (voir ci-dessous).

➤ Prélèvement au niveau de la veine cave inférieure

La souris est anesthésiée par une injection i.p. de pentobarbital disodique (Ceva Santé Animale, Libourne, France) dilué au 1/5 dans du NaCl 0,9% (60 mg/kg) , puis placée en décubitus dorsal. La paroi abdominale est incisée en prenant soin de ne pas abîmer le diaphragme. Les viscères sont dégagés grâce à une pince à bout rond afin de visualiser la veine cave inférieure. A l'aide d'une seringue et d'une aiguille préalablement citratées, 630 µl de sang y sont prélevés très doucement. L'échantillon de sang est immédiatement déposé dans un tube Eppendorf contenant 70 µl d'une solution de citrate de sodium (0,130 M). Les échantillons doivent ensuite être centrifugés dans les 2 heures qui suivent le prélèvement sanguin (voir ci-dessous).

➤ Préparation des échantillons

Les échantillons de sang sont centrifugés pendant 15 minutes à 1 500g (20°C) afin de récupérer le surnageant qui correspond au plasma pauvre en plaquettes (PPP). Le PPP est de nouveau centrifugé durant 10 minutes à 13 000g (20°C) et le surnageant est récupéré. Il s'agit du **PFP** (platelet free plasma) qui est analysé au cytomètre en flux après marquage des MPs.

A l'issue d'expériences préliminaires, nous avons souhaité améliorer la qualité du marquage des MPs. Pour cela, une étape de centrifugation (20 500g, 4°C, 1h30) des PFP a été ajoutée au protocole, afin d'isoler **le culot de MPs**. Ce culot est ensuite resuspendu dans du PBS filtré 0,1 µm avec un volume identique à celui du PFP initial, afin d'être analysé par cytométrie en flux.

b) Prélèvement du tissu cérébral et broyage

Le protocole a été adapté d'après celui utilisé par Leroyer et al. (2009). L'animal est anesthésié par injection de pentobarbital disodique (dilué au 1/5 ; 60 mg/kg ; Ceva Santé Animale, Libourne, France) puis exsanguinoperfusé comme décrit précédemment (paragraphe III). A l'aide d'un double scalpel, le cerveau est partagé en 3 parties et pour chacune, le cortex est isolé et placé dans un tube Eppendorf. Le poids du tissu est calculé avant de l'immerger dans une solution de DMEM filtrée 0,1 µm, tels que 100 mg de tissu soient repris dans 200 µl de DMEM. Le tissu est alors découpé finement à l'aide d'une paire de ciseaux pendant 15, 30 ou 45 secondes. L'homogénat résultant est soumis à des centrifugations successives afin d'éliminer les cellules et les débris potentiels :

- 400g, 15 minutes, 4°C => récupération du surnageant,
- 400g, 15 minutes, 4°C => récupération du surnageant,
- 13 500g, 5 minutes, 4°C => récupération du surnageant,
- 20 500g, 45 minutes, 4°C.

A l'issue de cette dernière centrifugation, le culot est resuspendu dans une solution de DMEM filtrée 0,1 µm (40 µl de DMEM sont utilisés pour 100 mg de tissu initial). L'échantillon est conservé à -80°C jusqu'au jour du dosage des MPs.

2. Dosage des microparticules

a) Principe du dosage des MPs par cytométrie en flux

Les MPs présentes dans les échantillons sont détectées grâce à un cytomètre en flux de dernière génération, de haute résolution et grande sensibilité (Gallios, Beckman Coulter, Brea, CA, États-Unis). L'utilisation de billes de calibration (diamètres : 0,3-0,5-0,9 µm ; Biocytex, Marseille, France) permet de définir, en fonction de la taille (forward scatter ; FS) et de la granulosité (side scatter ; SS), une fenêtre d'analyse dans laquelle se trouvent les événements de type microparticulaire (figure 30.A). De plus, l'utilisation de billes de quantification ajoutées en quantité connue dans les échantillons (SPHERO™, ACFP-50-5, Spherotech, Illinois, États-Unis) permet de quantifier ces événements pour en déduire leur nombre par µl d'échantillon.

Dans un second temps, les éléments contenus dans cette fenêtre d'analyse sont détectés par fluorescence afin de définir le pourcentage d'éléments positifs pour le marqueur étudié (figure 30.B). Différents marqueurs sont utilisés : CD144 (VE-cadhérine), CD31 (PECAM-1), CD41 (GPIIb) ou encore la phosphatidylsérine. L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel Flow-Jo (version 10.0.7; TreeStar, Ashland, OR).

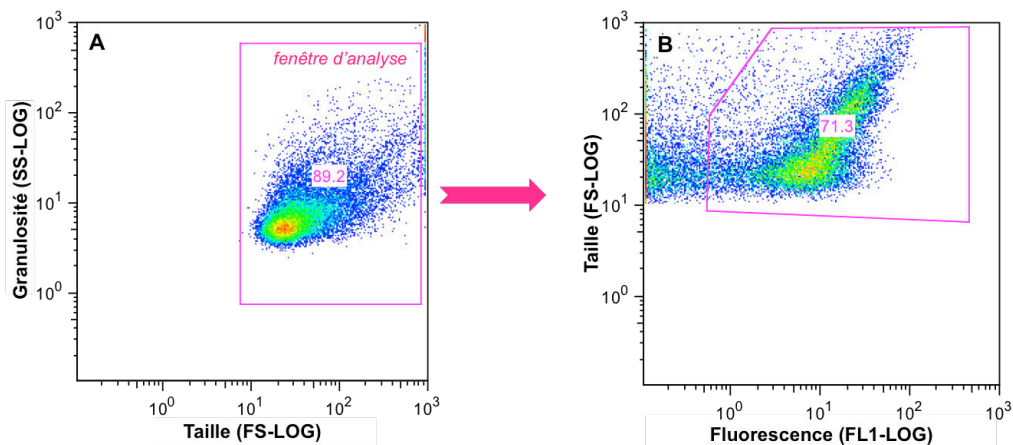


Figure 30 : Détection des microparticules par cytométrie en flux

A : Détermination du nombre d'évènements de type microparticulaire contenus dans la fenêtre d'analyse définie en fonction de la taille (forward scatter ; FS) et de la granulosité (side scatter ; SS). B : Evaluation du pourcentage d'évènements contenus dans la fenêtre d'analyse et exprimant un marqueur d'intérêt détecté par fluorescence.

b) Marquage CD144 (VE-cadhérine)

Le marquage CD144 a été réalisé à partir du PFP ou du culot de MPs issu de ce PFP.

- Deux tubes (20 µl d'échantillon/tube) sont incubés pendant 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière en présence de 100 µl de sérum de rat (5% ou 10% ; X0912, Dako, Les Ulis, France). Les préparations sont ensuite centrifugées (20 500g, 90 minutes, 4°C) et les culots sont resuspendus avec 100 µl de PBS. L'AC anti-CD144 (555289, BD Biosciences) est ajouté dans un premier tube, tandis que le second tube (contrôle négatif) est mis en présence de l'isotype correspondant à l'AC (553927, BD Biosciences). Après 20 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, une seconde centrifugation (20 500g, 90 minutes, 4°C) est réalisée et les culots sont resuspendus avec 100 µl de PBS. L'AC secondaire (551019, BD Biosciences) est alors ajouté dans chaque tube. L'incubation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Après une 3^{ème} centrifugation (20 500g, 90 minutes, 4°C), le culot est resuspendu dans 200 µl de PBS puis analysé au cytomètre en flux.

- De manière concomitante à ces deux premières préparations, un 3^{ème} tube contenant également 20 µl d'échantillon subit toutes les étapes décrites ci-dessus excepté l'incubation avec l'AC anti-CD144 et l'AC secondaire. Un volume de 20 µl de billes de quantification (SPHERO™, ACP-50-5, Spherotech, Illinois, États-Unis) est ajouté au mélange avant l'analyse au cytomètre en flux.

Notons que tous les tampons utilisés sont préalablement filtrés avec des filtres 0,1 µm.

c) Marquage CD31 (PECAM-1) et CD41 (GPIIb)

Les marquages ont été réalisés à partir du PFP ou du culot de MPs issu de ce PFP. Pour chaque marquage (CD31 et CD41), deux tubes (20 µl d'échantillon/tube) sont incubés pendant 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière en présence de l'AC primaire ou de l'isotype correspondant:

- pour CD31 : AC anti-CD31 couplé APC (561814, BD Biosciences) ou son isotype (553932, BD Biosciences),
- pour CD41 : AC anti-CD41 couplé PE (558040, BD Biosciences) ou son isotype (553925, BD Biosciences).

A l'issue de l'incubation, 200 µl de PBS filtré 0,1 µm sont ajoutés dans chaque tube. Les échantillons sont alors analysés au cytomètre en flux.

d) Marquage de la phosphatidylsérine par l'Annexine V

Le marquage de la phosphatidylsérine avec l'Annexine V (AnnV) a été réalisé à partir d'échantillons de PFP et de tissu cérébral. Le principe de ce marquage ainsi que les étapes de sa réalisation sont détaillés dans la 2^{ème} partie « Expérimentations *in vitro* » paragraphe V.2. L'AnnV utilisée provient de Roche Diagnostics (Meylan, France).

DEUXIÈME PARTIE : EXPÉRIMENTATIONS *IN VITRO*

I. Culture de cellules endothéliales cérébrales

Des cellules endothéliales immortalisées appartenant à la lignée bEnd.3 (ATCC CRL®-2299™, Manassas, Virginie, États-Unis) ont été utilisées pour l'ensemble des expériences réalisées *in vitro* (96091929-1VL, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Il s'agit de cellules endothéliales adhérentes obtenues à partir du cortex cérébral de souris BALB/c.

1. Protocole de culture cellulaire

Ces cellules ont été utilisées entre les passages 15 et 30. Les cellules sont mises en culture en flasques de 75 cm² (6x10⁴ cellules/cm²) dans un milieu contenant du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, high glucose 4,5 g/L ; D5796) enrichi en L-glutamine (2 mM), sérum de veau foetal (SVF ; 10%) décomplémenté, pyruvate de sodium (1 mM), acides aminés non essentiels (1%), pénicilline (50 U/ml) et en streptomycine (50 µg/ml). Les flasques sont placés dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO₂. L'ensemble de ces produits provient de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Lorsque les cellules atteignent 90% de confluence, ces dernières sont repiquées soit par hydrolyse enzymatique à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA à 0,25% (incubation de 4 minutes à 37°C ; T4299, Sigma-Aldrich), soit par une technique mécanique à l'aide d'un grattoir, en flasques ou en plaques.

2. Traitements des cellules

Lors de la réalisation des différentes expériences, les cellules sontensemencées en plaques 96 puits (4x10⁴ cellules/puits) ou 24 puits (2x10⁵ cellules/puits) en présence de milieu de culture contenant le SVF. Vingt-quatre heures après, les cellules sont traitées par différents agents pharmacologiques dans le milieu de culture dépourvu en SVF (les traitements utilisés sont listés dans la partie supérieure du tableau 8). Seul un changement de milieu (milieu sans SVF) a été réalisé pour les cellules contrôles.

Des inhibiteurs (partie inférieure du tableau 8) ont également été utilisés afin d'évaluer la contribution de différentes voies de signalisation dans la production de MPE. Ces inhibiteurs, dilués dans du milieu de culture dépourvu en SVF, sont appliqués une heure avant le traitement et pendant toute la durée de l'expérience, afin de maintenir une inhibition optimale de leur cible.

Tableau 8 : LISTE DES AGENTS PHARMACOLOGIQUES				
	Molécule	Concentration	Véhicule	Référence
T R A I T E M E N T	TNF	10, 50, 100, 200 ng/ml	PBS	T6674, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France
	Thrombine	2,5 UI/ml	tampon (Tris/NaCl/PEG)	Thrombine α humaine, HCT-0020, Haematologic Technologies Inc., Cryopep, Montpellier, France
	rt-PA	20, 40, 80 μ g/ml	eau ppi	Actilyse®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Allemagne
	Glutamate	5, 20, 50 mM	milieu de culture	G1626, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France
I N H I B I T E U R	SB203580 (inhibiteur de p38 MAPK)	10^{-5} M	DMSO	S8307, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France
	Y27632 (inhibiteur de ROCK)	10^{-6} M	H ₂ O	Y0503, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France
	Z-VAD-FMK (inhibiteur de caspases)	2×10^{-5} M	DMSO	FMK001, R&D systems, Lille, France
	PJ34 (inhibiteur de PARP)	10, 25, 50, 100 μ M	milieu de culture	P4365, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France
	INO-1001 (inhibiteur de PARP)	10, 100 μ M	milieu de culture	Inotek Pharmaceuticals, Massachusetts, Etats-Unis

Eau ppi : eau pour préparation injectable ; DMSO : diméthyl sulfoxyde

II. Étude de la morphologie cellulaire

La morphologie des cellulesensemencées en plaques 24 puits est observée à l'issue des incubations à l'aide d'un microscope inversé (VWR, Fontenay sous Bois, France), puis des photos représentatives des cultures sont prises (Moticam camera 580 5.0 MP, Motic, Barcelona, Spain).

III. Évaluation de la survie des cellules

La viabilité cellulaire est estimée par le test MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) réalisé sur des cellulesensemencées en plaques 96 puits (Kit MTT : TOX-1, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

Le principe de ce test est basé sur la réduction du MTT qui est de couleur jaune, en un produit violet, le formazan, par les déhydrogénases mitochondriales présentes dans les cellules viables. Ainsi,

l'intensité de la coloration violette est proportionnelle au nombre de cellules dont l'activité mitochondriale est intacte.

Le MTT est reconstitué dans du DMEM (low glucose, phenol red free ; D2429, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Un volume de 10 µl de cette solution est ajouté dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée 3 heures à 37 °C et 5% CO₂ à l'abri de la lumière. A l'issue de l'incubation, 80 µl d'une solution de solubilisation est ajoutée dans chaque puits ; l'absorbance à 570 nm corrigée par l'absorbance à 690 nm est alors mesurée au spectrophotomètre (SPECTROstar^{Nano}, BMG LABTECH, Chassigny sur Marne, France).

IV. Évaluation de l'expression des protéines de jonctions et d'adhésion par Western blot

L'expression par les cellules bEnd.3 de molécules de jonction (occludine et VE-cadhérine) et d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) a été évaluée par Western blot.

1. Préparation des échantillons et dosage des protéines

Après avoir éliminé les surnageants de culture, les plaques 24 puits sont placées à 4°C et les cellules sont lavées avec du PBS (500 µl/puits). Le PBS est éliminé et remplacé par 20 µl d'un tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM - NaCl 150 mM- Triton X-100 1% ; pH 7,4) contenant une pastille d'inhibiteurs de protéases « Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets » (1 pastille/10 ml ; 04693124001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne). Les cellules sont lysées directement dans les puits et extraites à l'aide d'une pointe de pipette prédécoupée. Les lysats cellulaires sont récupérés et centrifugés à 10 000g pendant 10 minutes à 4°C. Une partie des surnageants est utilisée pour le dosage des protéines par la méthode BCA précédemment décrite (se référer à la 1^{ère} partie « Expérimentations *in vivo* » paragraphe V.1.b) ; le reste des surnageants est dilué au 1/2 dans du tampon de Laemmli en conditions réductrices (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 - glycérol 10% - β-mercaptoéthanol 5% - SDS 4%), puis chauffé durant 10 minutes à 95°C, et enfin conservé à -40°C jusqu'au jour du Western blot.

2. Réalisation des Western blot

Les étapes de la réalisation des Western blot sont identiques à celles suivies lors des études *in vivo* (se référer à la 1^{ère} partie « Expérimentations *in vivo* » paragraphe V.1.c). Grâce aux résultats du dosage BCA, les échantillons sont déposés en quantité constante de protéines. Les protéines sont

séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5%. La fixation de l'AC primaire est révélée par chimiofluorescence (ECF). Les spécificités propres à chacune des protéines d'intérêt sont résumées dans le tableau 9.

Tableau 9 : CONDITIONS EXPÉRIMENTALES UTILISÉES AU COURS DES WESTERN BLOT			
Protéine d'intérêt	quantité de protéines / puits (µg)	AC primaire	AC secondaire
Occludine	10	AC de lapin anti-occludine (71-1500, Invitrogen) Dilution: 1/150	AC anti-IgG de lapin, couplé FITC (RPN5780, Amersham) Dilution: 1/1 000
VE-cadhérine	4 10	AC de chèvre anti-VE-cadhérine (sc-6458, Santa Cruz) Dilution: 1/400	AC anti-IgG de chèvre, couplé FITC (31533, Pierce) Dilution: 1/200
ICAM-1	10	AC de chèvre anti-ICAM-1 (AF796, R&D Systems) Dilution: 1/2 000	AC anti-IgG de chèvre, couplé FITC (31533, Pierce) Dilution: 1/200
VCAM-1	10	AC de lapin anti-VCAM-1 (sc-8304, Santa Cruz) Dilution: 1/1 000	AC anti-IgG de lapin, couplé FITC (RPN5780, Amersham) Dilution: 1/1 000
Actine	4 10	AC de lapin anti-actine (A-2066, Sigma) Dilution: 1/10 000	AC anti-IgG de lapin, couplé FITC (RPN5780, Amersham) Dilution: 1/1 000

V. Dosage des microparticules endothéliales (MPE)

1. Isolation des MPE

Les cellules bEnd.3 sontensemencées en plaques 24 puits. A l'issue des traitements, le milieu de culture est récupéré afin d'isoler les MPE par deux centrifugations successives : une première centrifugation (600 g, 15 minutes, 4°C) permet d'éliminer les débris cellulaires, puis une seconde centrifugation (20 500g, 90 minutes, 4°C) permet d'isoler le culot de MPE. Ce culot est ensuite resuspendu avec du tampon PBS filtré 0,1 µm : pour un volume initial de milieu de culture de 1,5 ml par exemple, le culot est alors resuspendu dans 150 µl de PBS (rapport 10:1). Enfin, les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'au jour du dosage par cytométrie en flux.

2. Marquage des MPE par l'annexine V et dosage par cytométrie en flux

➤ Principe du marquage

Les MPE sont détectées grâce à un marquage à l'Annexine V (AnnV). En effet, en présence de calcium, l'AnnV se lie de manière spécifique à la phosphatidylsérine présente sur le feuillet externe des MPE. L'AnnV étant couplée à la fluorescéine (FITC), elle est détectée par fluorescence au cytomètre en flux (Gallios, Beckman Coulter, Brea, CA, États-Unis) ; le principe de détection des MPE par cytométrie est identique à celui précédemment décrit (se référer à la 1^{ère} partie « Expérimentations *in vivo* » paragraphe VI.2.a). Un tube « contrôle négatif » est également réalisé en présence d'AnnV mais en absence de calcium afin de détecter le marquage non spécifique (figure 31). Pour chaque échantillon, le nombre d'évènements de taille microparticulaire et marqués spécifiquement à l'AnnV (MPE_AnnV+) est calculé selon la formule : (nombre de MPE ayant fixé l'AnnV en présence de calcium) - (nombre de MPE ayant fixé l'AnnV en absence de calcium) ; pour chaque série de culture (n), ce nombre est rapporté à la valeur des cellules contrôles correspondantes et est exprimé en pourcentage.

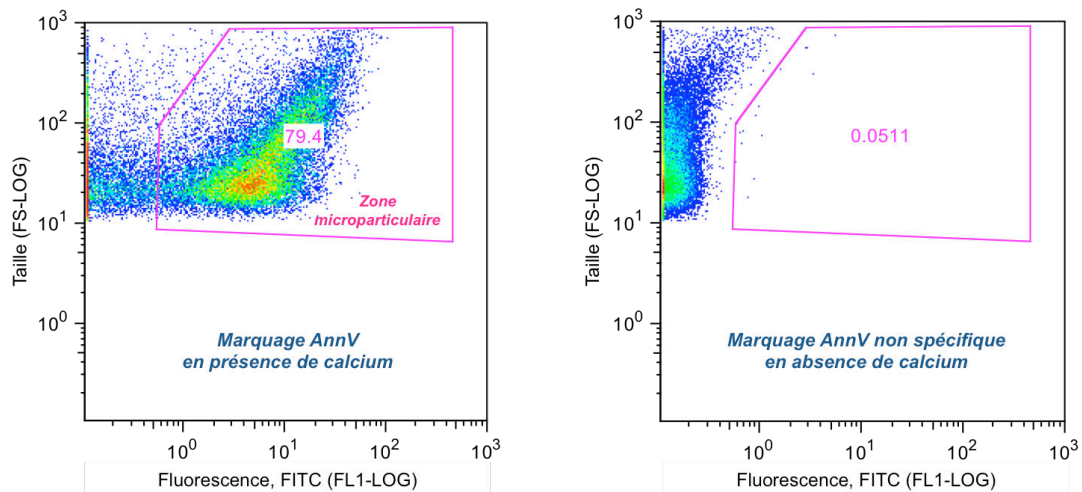


Figure 31 : Détection des MPE issues des cellules bEnd.3 par cytométrie en flux après marquage par l'AnnV

➤ Protocole du marquage

Pour chaque échantillon, 3 préparations sont réalisées :

- un volume de 10 ou 20 µl d'échantillon est incubé pendant 30 minutes à 4°C à l'obscurité dans respectivement 110 ou 100 µl de tampon contenant du calcium (HEPES 10 mM - NaCl 140 mM - CaCl₂ 5 mM - pH 7,4) et en présence d'AnnV couplée au FITC (AnnV-FITC ; 42 ng/ml ; IM3546, Beckman Coulter, Brea, CA, États-Unis).
- Le tube « contrôle négatif » est réalisé dans les mêmes conditions, en présence d'AnnV-FITC mais dans un tampon dépourvu en calcium (HEPES 10 mM - NaCl 140 mM - pH 7,4) ; selon les

études, de l'EDTA (1,6 mM) a pu être ajouté dans ce tampon (EDTA disodique ; E5134, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

- De manière concomitante à ces deux premières préparations, le même volume d'échantillon (*i.e.* 10 ou 20 µl selon les études) est dilué dans respectivement 100 ou 80 µl de tampon (HEPES 10 mM - NaCl 140 mM - pH 7,4). Un volume identique de billes de quantification (10 ou 20 µl ; SPHERO™, ACFP-50-5, Spherotech, Illinois, États-Unis) est ajouté au mélange qui est immédiatement analysé au cytomètre en flux, afin d'en déduire le nombre de MPs par µl d'échantillon.

Notons que tous les tampons utilisés sont préalablement filtrés avec des filtres 0,1 µm.

ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés en moyenne ± sd (déviation standard). L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel Statview 5.0 (Abacus Concept Inc., France). Les tests statistiques utilisés pour chaque étude sont les suivants :

- Pour les expériences réalisées *in vivo*, une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de Bonferroni corrigé pour les Western blot (ICAM-1, VCAM-1, fibrine) ; un test de Kruskal Wallis suivi d'un test U de Mann et Whitney corrigé pour les IHC (ICAM-1, VCAM-1). Le profil d'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 en fonction des niveaux de coupes de cerveau a été analysé par le test de Wilcoxon.
- Pour les expériences réalisées *in vitro* (étude des MPE, viabilité cellulaire et Western blot), une analyse de variance (ANOVA) suivie soit d'un test de Dunnet si les groupes sont comparés au groupe contrôle, soit d'un test de Bonferroni corrigé dans le cas de comparaisons multiples.

Une différence a été considérée significative pour une valeur de $P < 0,05$.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

PREMIÈRE PARTIE

Études *in vivo* des effets vasculaires du rt-PA au cours de l'ischémie cérébrale

I. Prise en main du modèle d'ischémie cérébrale par injection de thrombine chez la souris

Nous avons choisi de travailler sur un modèle d'ischémie cérébrale focale qui consiste à injecter de la thrombine dans la lumière de l'artère cérébrale moyenne (ACM) afin d'y former un caillot qui occlut l'artère. Ce modèle a été mis au point par l'équipe du Pr Vivien à Caen (Orset et al., 2007) et a été introduit au laboratoire en 2009 par Bérard Coqueran et le Dr El Amki.

Par rapport aux modèles d'ischémie plus fréquemment retrouvés dans la littérature que sont les modèles « mécaniques » (occlusion de l'artère le plus souvent par un filament), ce modèle par injection de thrombine présente l'avantage de mieux mimer la physiopathologie d'une ischémie clinique puisque l'occlusion de l'artère est induite par un caillot formé *in situ*. Ainsi, ce modèle permet en particulier d'étudier les effets de la thrombolyse par le rt-PA. Notons également que par rapport aux modèles par injection d'un caillot sanguin autologue dans l'artère, ce modèle permet de mieux contrôler la localisation du caillot et d'induire des lésions plus reproductibles.

Lorsque j'ai commencé ma thèse, il avait été montré au laboratoire que l'administration tardive de rt-PA dans ce modèle entraînait une altération de la BHE et une augmentation de la survenue des TH ; de plus, le PJ34, puissant inhibiteur de PARP, permettait de s'opposer à ces atteintes. Aussi, il nous a semblé pertinent de choisir ce modèle pour l'étude de la toxicité vasculaire du rt-PA et de l'implication de la PARP.

1. Prise en main du modèle

Le modèle d'ischémie cérébrale par injection de thrombine est un modèle particulièrement délicat à réaliser. Près de 8 mois m'ont été nécessaires pour apprendre à en effectuer la microchirurgie. Certaines étapes sont critiques, comme le retrait de la dure-mère, le positionnement et l'angle d'inclinaison de la micropipette au niveau de l'ACM, et son insertion dans l'artère sans provoquer d'hémorragie.

Lorsque ces gestes chirurgicaux ont été parfaitement maîtrisés, j'ai réalisé 3 lots d'animaux en injectant pour chaque souris 1 μ l d'une solution de thrombine à 0,75 UI/ μ l ; cette quantité de thrombine étant celle du protocole alors utilisé au laboratoire (El Amki et al., 2012), lui-même établi d'après l'équipe du Pr Vivien (Orset et al., 2007). Nous avons évalué la reproductibilité du modèle par la mesure de différents paramètres résumés dans le tableau 10. Nous nous sommes en particulier intéressés aux reperfusions spontanées intervenant dans les 30 minutes qui suivent l'injection de thrombine. Parmi les animaux ayant présenté une chute stable du DSC pendant plus de 30 minutes, le taux de mortalité et le volume de lésion ont été évalués 24 heures après la chirurgie.

a) Résultats

La grande majorité des accidents chirurgicaux correspond à des ruptures de l'ACM lors du retrait de la dure-mère ou au moment de l'insertion de la pipette. Le taux d'accidents chirurgicaux est de 36% pour la 1^{ère} série d'animaux et lors de la dernière série, aucun accident chirurgical ne s'est produit (tableau 10).

Au cours des 30 minutes qui suivent l'injection de thrombine, la chute de DSC n'est pas restée stable chez un certain nombre de souris, ce qui correspond à des reperfusions spontanées (RS). Pour ces souris, nous avons pu constater que l'augmentation du DSC se produit entre 15 et 25 minutes. Par ailleurs, le taux de RS est variable d'une série à l'autre puisque pour les séries 1 et 3, ce taux est respectivement de 32% et 23% tandis qu'au cours de la série 2 aucune RS ne s'est produite.

Parmi les animaux ayant présenté une chute du DSC stable pendant 30 minutes, le taux de mortalité à 24 heures est très variable d'une série à l'autre (série 1 : 16% ; série 2 : 0% ; série 3 : 29%). Chez les souris vivantes 24 heures après l'ischémie, le volume de lésion a été évalué après coloration des cerveaux par le TTC. Le taux de souris sans lésion est de 37% pour la série 1, de 29% pour la série 2 et de 24% pour la série 3.

Enfin, chez les souris présentant une lésion, le volume est faible pour les séries 1 et 2 (respectivement 11,4 \pm 5,8 mm³ et 12,8 \pm 5,4 mm³) et la variabilité élevée (>42%). Néanmoins, pour la série 3, le volume de lésion atteint 22,7 \pm 6,6 mm³ avec une variabilité fortement diminuée (29,3%).

Tableau 10 : Principaux paramètres évalués au cours de l'apprentissage du modèle d'ischémie cérébrale (thrombine à 0,75 UI/ μ L)

	Série 1 n = 44	Série 2 n = 10	Série 3 n = 22
Durée d'injection de la thrombine (moyenne \pm sd)	7,7 \pm 6,0 min	4,7 \pm 0,4 min	5,7 \pm 1,1 min
Accidents chirurgicaux	36% (16/44)	30% (3/10)	0%
Reperfusion spontanée	32% (9/28)	0%	23% (5/22)
Mortalité	16% (3/19)	0%	29% (5/17)
Absence de lésion	37% (7/19)	29% (2/7)	24% (4/17)
Souris avec lésion	47% (9/19)	71% (5/7)	47% (8/17)
Volume lésion (TTC) moyenne \pm sd	11,4 \pm 5,8 mm ³	12,8 \pm 5,4 mm ³	22,7 \pm 6,6 mm ³
Variabilité	50,9%	42,1%	29,3%

b) Discussion

Le modèle d'ischémie cérébrale par injection de thrombine a été introduit au laboratoire par le Dr El Amki ; ce doctorant obtenait dans sa pratique courante un taux de RS de 12%, un taux de mortalité à 24 heures de 16% ainsi que des volumes de lésion compris entre 18,5 mm³ (coloration au violet de crésyl) et 22,6 mm³ (coloration au TTC) avec 36% de variabilité. Pour ma part, suite à la réalisation de 3 séries de souris ischémisées, j'ai pu constater : (1) un nombre plus élevé de souris présentant des RS, (2) des taux anormalement élevés d'animaux sans lésion, (3) des volumes de lésions faibles avec de fortes variabilités pour les deux premiers lots de souris. Plusieurs raisons pourraient expliquer ces effets:

- **La durée de la chirurgie** (temps entre le début de l'anesthésie et l'injection de la thrombine) était très élevée en début d'apprentissage (environ 1 heure par souris), ce qui a nécessité une administration récurrente d'anesthésiques. Pendant la chirurgie, bien que la température corporelle des animaux soit maintenue à 37 \pm 0,5°C à l'aide d'une couverture chauffante thermostatée, il est toutefois possible que la température cérébrale ait diminué à la suite de cette anesthésie prolongée. Or il a été montré que **l'hypothermie** protège le cerveau des dommages ischémiques (Connolly et al., 1996b), ce qui pourrait donc expliquer les faibles volumes d'infarctus observés chez certains animaux ainsi que la grande variabilité des séries 1 et 2. Pour la série 3, le temps opératoire moyen a été réduit à 35 minutes, et nous avons obtenu un volume de lésion de 22,7 \pm 6,6 mm³ avec une variabilité de 29,3%, ce qui est en adéquation

avec les données obtenues au laboratoire et par d'autres équipes (Langhauser et al., 2012; Jullienne et al., 2011; Macrez et al., 2011).

- **Les caillots** formés lors de l'injection de la thrombine au cours de ces 3 séries d'animaux ont semblé particulièrement **instables**. En effet, nous avons constaté visuellement, sous la loupe binoculaire, que lors de l'injection de la thrombine, le réseau de fibrine semblait se former avec difficulté. Aussi, il n'est pas exclu que la fibrinolyse endogène pourrait être suffisante pour désagréger des caillots fragiles. Cette hypothèse pourrait expliquer les taux élevés de RS pour les séries 1 et 3, ainsi que l'absence de lésion chez certains animaux.

Les données de la littérature indiquent que dans ce modèle, le taux de RS varie d'une étude à l'autre (Tableau 11). Au laboratoire, les expériences antérieures montrent que 12% des souris présentent une RS dans les 30 minutes suivant l'injection de thrombine. Ce taux est de 16,9% dans les travaux menés par l'équipe de García-Yébenes et al. (2011). Deux études plus récentes réalisées par Ansar et collaborateurs ont indiqué des taux moyens de RS de 36% (Ansar et al., 2014b) et de 38% (Ansar et al., 2014a), ces RS se produisant respectivement dans les 20 minutes et dans les 10 minutes après l'injection de thrombine.

Par ailleurs, Durand et al. (2012) ont noté que la forte variabilité du volume de lésion est liée non seulement aux RS précoces, c'est-à-dire intervenant dans les 30 minutes, mais également à des reperfusion spontanées plus tardives qui surviennent dans les 24 heures après l'ischémie. L'étude d'Ansar et al. (2014b) a estimé que le taux de RS tardives qui se produisent plus de 2 heures après l'ischémie s'élève à 20%.

Tableau 11 : Taux de RS observés dans le modèle par injection de thrombine

Références	Taux de RS précoces (%)	Quantité de thrombine (UI)	Souche de souris
El Amki, ➔ données du laboratoire	12	0,75	Swiss
Durand et al., 2012	15	0,75	Swiss
García-Yébenes et al., 2011	16,9	2	Swiss
Ansar et al., 2014b	42	1,5	C57BL/6
	30	3	
Ansar et al., 2014a	38	1,5	C57BL/6
Orbe et al., 2011	68,7	1	C57BL/6
	30	2	

RS précoces : reperfusion spontanées intervenant dans les 30 minutes qui suivent l'injection de thrombine

Afin d'obtenir des caillots plus stables et par conséquent un taux de RS proche de celui obtenu au laboratoire par le Dr El Amki, j'ai apporté quelques modifications au protocole. En effet, nous avons remarqué qu'au cours de la réalisation de ce modèle, la stabilité des caillots dépendait de plusieurs paramètres :

- **la vitesse d'injection** de la thrombine : une durée d'injection trop lente (> 5 minutes retrouvée lors des séries 1 et 3, tableau 10) ou trop rapide (< 3 minutes) ne permet pas à la thrombine de former un réseau compact et solide de fibrine. La durée optimale a donc été définie entre 3 et 5 minutes.

La vitesse d'injection est réglée manuellement par l'expérimentateur. Elle dépend également du biseautage de la micropipette de verre car plus le diamètre de la pipette d'injection est important, plus la vitesse d'injection est rapide.

Le biseautage de la pipette ainsi que la régulation de la vitesse d'injection se font manuellement et sont donc des étapes particulièrement dépendantes de chaque expérimentateur.

- **Le mode d'injection** : nous avons constaté qu'une injection à vitesse constante est moins efficace qu'une injection en 2 temps. En effet, il est préférable d'injecter rapidement les deux premiers tiers de la solution de thrombine immédiatement après l'insertion de la pipette afin de déclencher rapidement la formation d'un caillot, puis d'injecter doucement le tiers restant de thrombine, ce qui permet de consolider le caillot initial.

- **L'insertion de la pipette** semble également une étape clé. Nous avons ainsi pu constater qu'une pipette qui pénètre difficilement dans le vaisseau ou après plusieurs tentatives sera à l'origine d'une brèche vasculaire qui permettra au caillot de fibrine de mieux adhérer à l'endothélium et donc d'être plus stable. Par ailleurs, nous avons noté qu'en pratique, lors de l'insertion de la micropipette, sa localisation et son enfoncement au niveau de la bifurcation de l'artère est un paramètre également important qui conditionne la stabilité du caillot.

- **La quantité de thrombine injectée** : Il est important de noter que dans la littérature, les quantités de thrombine injectée diffèrent d'une étude à l'autre (tableau 11), et certaines études suggèrent que plus la quantité de thrombine injectée est importante, plus le caillot formé est stable et plus le taux de RS est faible. En particulier, les travaux d'Orbe et al. (2011) ont montré que l'utilisation d'1 UI de thrombine est associée à 68,7% de RS, alors que l'administration de 2 UI permet de diminuer ce taux de RS à 30%. Notons que la quantité de thrombine à injecter semble également dépendre de la souche de souris utilisée ; d'après Ansar et al. (2014b), il est

nécessaire d'augmenter les doses de thrombine injectée aux souris C57BL/6 afin d'obtenir des volumes de lésion similaires à ceux observés chez les souris Swiss.

Afin d'obtenir des caillots plus stables, 3 autres séries d'animaux ischémiés ont ensuite été réalisées en augmentant la concentration de la solution de thrombine injectée de (1 UI/ μ l puis 1,9 UI/ μ l).

2. Modifications du protocole

a) Augmentation de la concentration de la solution de thrombine

Nous avons procédé au dosage de l'activité de la thrombine avec l'aide du Dr Le Bonniec (UMR_S1140 Inserm, Université Paris Descartes) afin d'obtenir des solutions de thrombine plus concentrées.

Un premier essai a donc été réalisé sur 15 animaux en injectant 1 μ l d'une solution de thrombine à 1 UI/ μ l. Les résultats sont présentés dans le tableau 12 (série 4). L'augmentation de la quantité de thrombine a permis d'améliorer plusieurs paramètres puisque toutes les souris ischémiées présentent une lésion à 24h, dont le volume moyen après coloration par le TTC est de $19 \pm 6,3 \text{ mm}^3$, avec une variabilité de 32,9% (figure 32, série 4).

Tableau 12 : Principaux paramètres évalués suite aux modifications du protocole d'ischémie cérébrale (thrombine à 1 et 1,9 U/ μ L)

	Thrombine : 1 UI/ μ L		Thrombine : 1,9 UI/ μ L	
	Série 4 n = 15	Série 5 n = 12	Série 6 n = 11	
Durée d'injection de la thrombine (moyenne \pm sd)	4,8 \pm 0,7 min	4,0 \pm 0,4 min	4,5 \pm 0,5 min	
Reperfusion spontanée	33% (5/15)	17% (2/12)	18% (2/11)	
Mortalité	30% (3/10)	30% (3/10)	22% (2/9)	
Absence de lésion	0%	0%	0%	
Souris avec lésion	70% (7/10)	70% (7/10)	78% (7/9)	
Volume lésion (TTC) moyenne \pm sd Variabilité	19 \pm 6,3 mm^3 32,9%	20,9 \pm 10,3 mm^3 49,0%		
Volume lésion (violet de crésyl) moyenne \pm sd Variabilité			17,2 \pm 6,5 mm^3 37,6%	

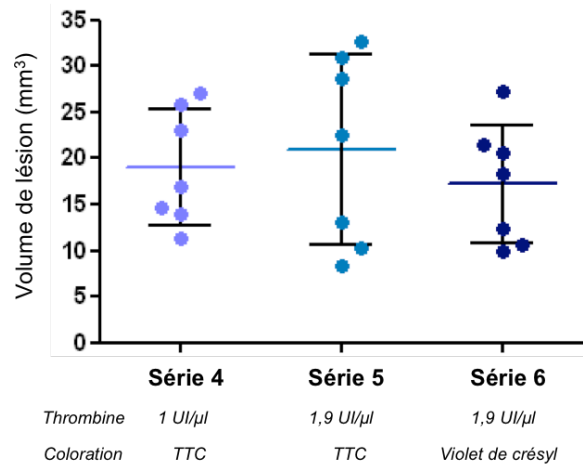


Figure 32 : Volumes de lésion évalués 24 heures après l'ischémie

Le taux de reperfusion étant encore élevé (33%), nous avons de nouveau augmenté la quantité de thrombine en passant à 1,9 UI/μl. Deux séries de souris ont été réalisées avec cette concentration et deux colorations différentes ont permis de quantifier les lésions: une coloration par le TTC pour la série 5 et par le violet de crésyl pour la série 6.

Comme l'illustre le tableau 12 (séries 5 et 6), l'augmentation de la quantité de thrombine jusqu'à 1,9 UI a permis d'obtenir des taux faibles de RS précoces (série 5 : 17%, série 6 : 18%) proches de ceux obtenus au laboratoire lors d'études antérieures (*i.e.* 12%). De plus, les taux de mortalité ainsi que les volumes de lésion sont en adéquation avec les données du laboratoire et de la littérature (figure 32, série 5 et 6).

La figure 33 montre la répartition de la lésion en fonction des niveaux de coupes après coloration par le violet de crésyl (série 6). La lésion s'étend du niveau 2 au niveau 13, et la surface maximale de lésion se situe entre les niveaux 4 et 9.

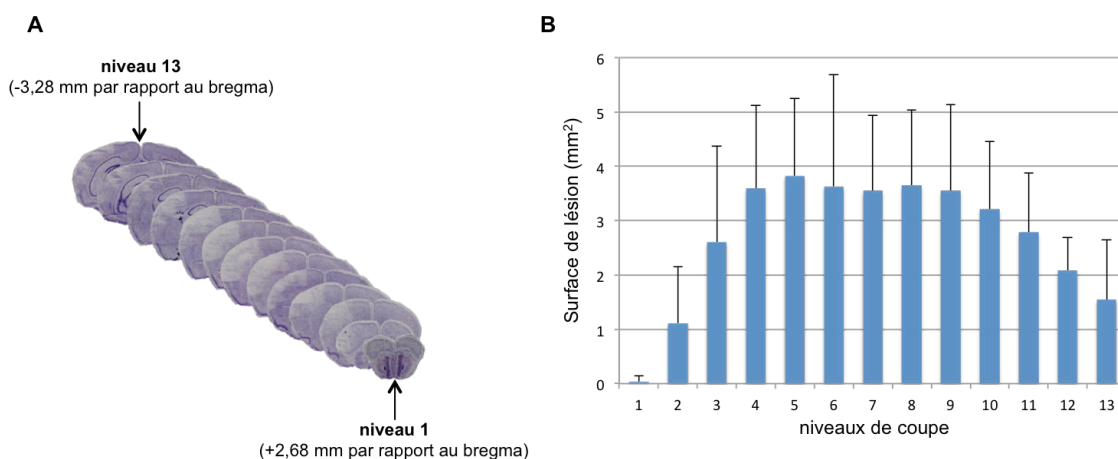


Figure 33 : Répartition de la surface de lésion en fonction des niveaux de coupe 24 heures après l'ischémie (série 6)

A : Photo représentative des 13 niveaux de coupe d'un cerveau de souris ischémiée après coloration par le violet de crésyl.
 B : Surface de lésion en fonction du niveau de coupe. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sd. n=7.

Au vu de ces résultats, la concentration de 1,9 UI/ μ l de thrombine a été retenue pour la suite des travaux.

b) Évolution du modèle dans le temps

Au bout de quelques mois et après plusieurs séries d'ischémie, nous avons été amenés à utiliser un nouveau lot de thrombine que nous avons dosé pour obtenir comme précédemment, une solution à 1,9 UI/ μ L. Néanmoins, avec cette nouvelle solution de thrombine, le remplissage des micropipettes est devenu difficile (remplissage par aspiration ; cf Matériel et Méthodes, paragraphe I). Après différents essais, nous avons remarqué que ce problème dépendait non seulement des lots de thrombine, mais également de la concentration de la solution de thrombine. En augmentant la concentration à 1,9 UI/ μ L, il est possible que la thrombine ait précipité et formé des agrégats susceptibles de s'opposer au remplissage des pipettes. Afin de s'affranchir de ce problème, nous avons centrifugé la solution de thrombine avant remplissage de la pipette (13 000g, 4 minutes, 4°C). Néanmoins, bien que cette étape supplémentaire ait permis le remplissage correct des pipettes, elle a également entraîné une diminution de la concentration en thrombine, passant de 1,9 UI/ μ L avant centrifugation à 1,3 UI/ μ L. Pour la suite des études, c'est donc cette dernière concentration de thrombine que nous avons utilisée.

Une fois le modèle pris en main, nous avons pu nous intéresser dans un premier temps à l'effet du rt-PA sur les phénomènes d'hypoperfusion et de réocclusion *via* la détection des dépôts de fibrine.

II. Rôle du rt-PA dans les phénomènes d'hypoperfusion et de réocclusion : étude des dépôts de fibrine

Il a été montré au laboratoire que l'administration tardive du rt-PA (4 heures après le début de l'ischémie) est à l'origine d'une reperfusion incomplète : dans les 2 heures qui suivent son administration, le DSC ne dépasse jamais 40% du DSC initial. Cet effet a été mis en évidence non seulement avec la dose de rt-PA couramment utilisée en préclinique, soit 10 mg/kg, mais également avec celle utilisée en clinique, 0,9 mg/kg (El Amki et al., 2012). De manière intéressante, il a également été montré que l'association du PJ34 (inhibiteur de PARP) au rt-PA, a permis d'induire une reperfusion complète (El Amki et al., en préparation).

Nous avons donc cherché si l'hypoperfusion induite par le rt-PA est associée à une accumulation de dépôts de fibrine dans les vaisseaux après 24 heures d'ischémie, et si le PJ34 diminue ces phénomènes de thrombose.

Nous nous sommes placés dans un premier temps 30 minutes après l'injection de thrombine afin de localiser le caillot à l'origine de l'ischémie. Dans un second temps, nous avons évalué l'effet de l'ischémie et d'une administration tardive de rt-PA associé ou non au PJ34 sur la présence de fibrine par Western blot à 24 heures.

1. Localisation du caillot 30 minutes après l'injection de thrombine

Dans un premier temps, 5 souris ont subi l'ensemble des étapes de la chirurgie excepté l'injection de thrombine. Nous avons ainsi pu définir les coordonnées stéréotaxiques correspondant à la bifurcation de l'artère. Dans un second temps, quelques microgouttes d'un colorant (bleu de bromophénol) ont été injectées dans le parenchyme qui borde cette bifurcation. Ces souris ont été immédiatement euthanasiées et des coupes coronales ou sagittales des cerveaux réalisées au cryostat ont permis de visualiser la zone dans laquelle se trouve la bifurcation (figure 34).

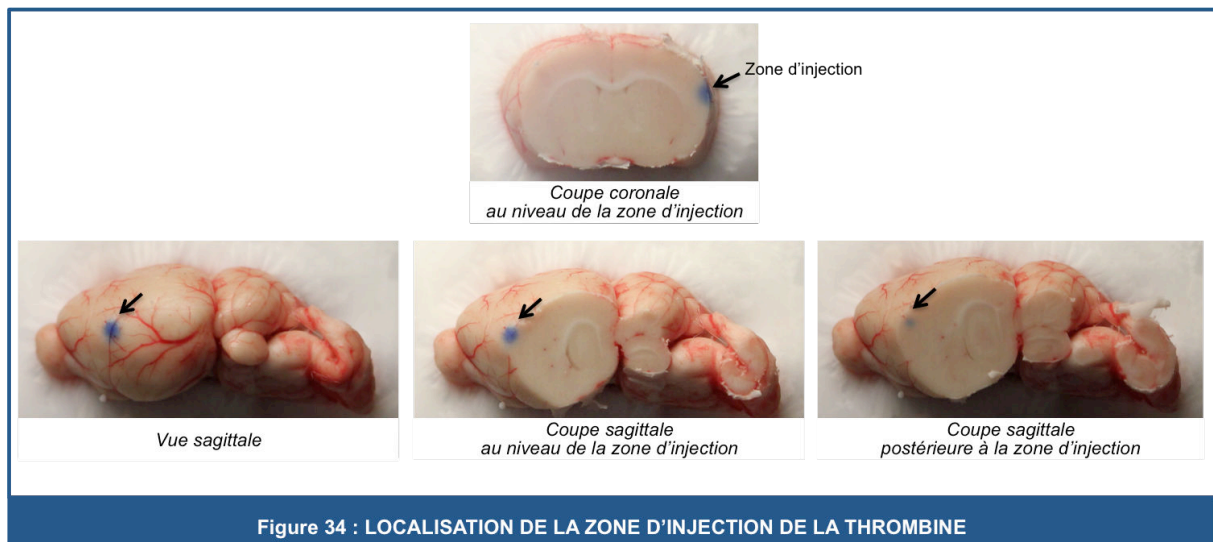


Figure 34 : LOCALISATION DE LA ZONE D'INJECTION DE LA THROMBINE

L'ensemble de ces données (coordonnées stéréotaxiques et visualisation du bleu de bromophénol) a été rapporté sur l'atlas de Paxinos et Franklin (1997). Ainsi, la bifurcation est localisée dans une zone qui se situe entre 3 - 4,25 mm en profondeur, et 2 - 0 mm en antériorité par rapport au bregma (figure 35).

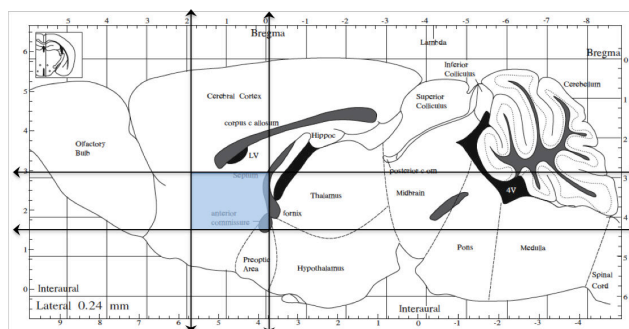


Figure 35 : Localisation de la zone d'injection de la thrombine d'après l'atlas de Paxinos et Franklin (1997)

Nous avons ensuite souhaité visualiser par un immunomarquage de la fibrine, le caillot formé dans l'ACM 30 minutes après l'injection de thrombine. Pour cela, une souris a été euthanasiée à 30 minutes et son cerveau prélevé. Grâce aux coordonnées précédemment définies, le marquage de la fibrine a été effectué sur des coupes horizontales de 10 μ m d'épaisseur réalisées au niveau de la bifurcation.

Nous avons alors constaté que 30 minutes après l'injection de thrombine, la lumière de l'ACM est bien occluse par un caillot riche en fibrine (figure 36.A), ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Orset et collaborateurs lors de l'élaboration de ce modèle (Orset et al., 2007).

Par ailleurs, nous avons également mis en évidence un marquage en dehors de l'ACM, localisé dans les microvaisseaux. Ce marquage microvasculaire est concentré à proximité du caillot au sein du parenchyme cérébral (figure 36.B). Ces dépôts de fibrine ont pu d'une part être formés du fait de l'injection de thrombine dans l'artère et dont une partie s'est échappée dans la circulation. D'autre part, la présence de fibrine peut être la conséquence de la fibrinolyse endogène qui, en dégradant le thrombus, pourrait libérer des micro-thrombi dans la microcirculation. Enfin, la présence de fibrine pourrait être une conséquence de l'ischémie ; en effet, au cours des 30 minutes d'ischémie, une activation de la cascade de la coagulation a pu se produire dans les microvaisseaux en souffrance et conduire à la formation de fibrine.

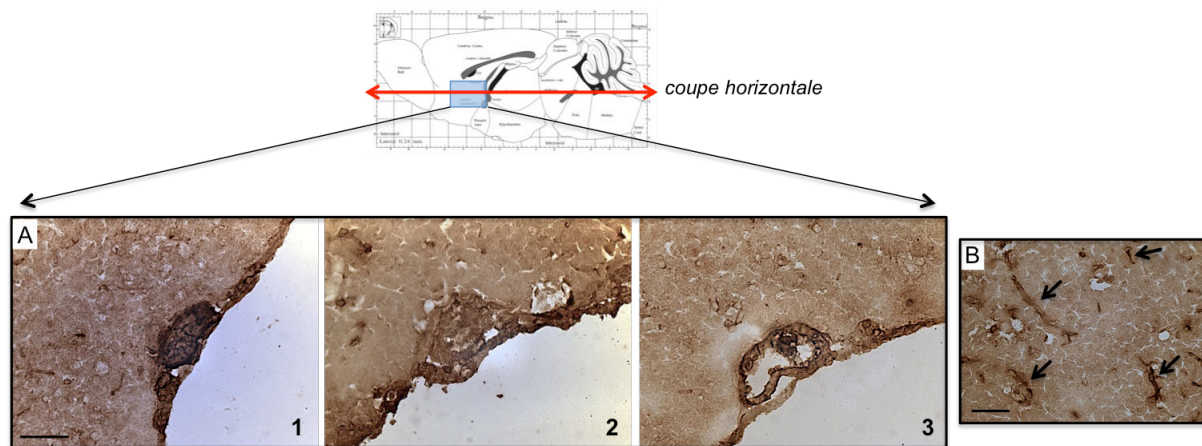
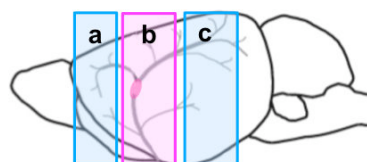


Figure 36 : Localisation du caillot de fibrine dans l'artère cérébrale moyenne après 30 minutes d'ischémie

La présence de fibrine a été détectée par un immunomarquage sur des coupes horizontales de 10 µm d'épaisseur. A : Les photos 1 et 2 montrent l'ACM en coupe transversale au niveau du site d'injection de la thrombine. Trente minutes après l'injection, l'artère contient un caillot riche en fibrine qui l'occlut. La photo 3 a été prise en aval de la zone d'injection de la thrombine, la lumière de l'ACM n'est pas occluse par la fibrine. B : Les flèches indiquent la présence de dépôts de fibrine également localisés dans les microvaisseaux situés à proximité de l'ACM. La barre d'échelle représente 50 µm.

Ces travaux nous ont permis de définir la région du cerveau contenant le caillot à l'origine de l'ischémie ; cette région sera par la suite appelée région b et les deux régions adjacentes, a et c, comme l'illustre le schéma ci-dessous :



Nous avons ensuite évalué à 24 heures l'effet du rt-PA et du PJ34 sur la présence de fibrine par Western blot au sein de ces trois régions cérébrales.

2. Étude des dépôts de fibrine 24 heures après l'ischémie cérébrale : effet du rt-PA

a) Mise au point du Western blot de fibrine

Les dépôts de fibrine sont issus de l'association de plusieurs molécules de fibrinogène et forment un réseau extrêmement structuré, complexe et très volumineux qu'il n'est pas possible de détecter tel quel par Western blot. L'évaluation de la fibrine par cette technique requiert donc au préalable une étape particulière de broyage et de traitement des échantillons, afin de désassembler le réseau de fibrine et de libérer les chaînes qui la composent ; ces chaînes, de plus petites masses moléculaires, sont ensuite détectables par Western blot. Il peut s'agir des dimères γ - γ , des dimères α - α ou encore de la chaîne β (52 kDa). Cette chaîne β a l'avantage d'être plus facilement détectable par Western blot car cette dernière ne forme pas de dimère et n'est donc présente que sous une seule forme. Par conséquent, nous avons choisi de quantifier la chaîne β comme reflet de la présence de fibrine dans nos échantillons. Pour cela, j'ai choisi d'utiliser le protocole de l'équipe du Dr Zlokovic, et qui a été décrit par Tabrizi et al. (1999), puis Ninomia et al. (2000) et enfin Shibata et al. (2001). Ce travail a été réalisé avec l'aide du Dr Le Bonniec (UMR_S1140 Inserm, Université Paris Descartes) et du Dr Palmier, responsable de la biochimie au sein de notre équipe de recherche.

La préparation des échantillons de cerveaux nécessite plusieurs étapes d'extraction afin d'éliminer l'ensemble des protéines solubles, de cliver le réseau de fibrine et d'isoler *in fine* le culot contenant des fragments de fibrine. Ainsi, il s'avère notamment nécessaire d'incuber les échantillons en présence de fortes concentrations d'urée qui permettent de dissocier le caillot, ou encore de resuspendre le culot dans un milieu réducteur et dénaturant.

Notons qu'avec ce protocole particulier de broyage et d'extraction, le culot final ne contient plus que les chaînes de fibrine ; ainsi, l'actine a été éliminée dans les fractions solubles au cours des centrifugations successives. La quantification des Western blot de fibrine n'a donc pu être corrigée par celle de l'actine.

D'après les observations faites précédemment, nous savions que 30 minutes après avoir injecté la thrombine au niveau de la bifurcation de l'ACM, la lumière de cette artère contenait un caillot riche en fibrine. Par conséquent, des homogénats de cerveaux de souris ischémiées euthanasiées 30 minutes après l'ischémie et de souris naïves ont servi à mettre au point le protocole de broyage et de Western blot. Les essais ont été réalisés dans la région b où se trouve la bifurcation de l'ACM et donc le caillot de fibrine. Bien que l'anticorps (AC) anti-fibrine utilisé reconnaisse également le fibrinogène circulant, il n'a pas été nécessaire de perfuser les animaux avant leur euthanasie puisque le fibrinogène circulant est éliminé au même titre que les protéines solubles lors des étapes d'extraction.

Au cours des premiers essais, nous avons constaté qu'à l'issue du broyage et de l'extraction, les échantillons étaient particulièrement visqueux, ce qui a fortement perturbé leur migration au cours du Western blot. Après révélation des membranes, nous avons observé un voile noir qui masquait tout signal potentiel, et ce, même après diminution de la quantité de protéines déposées (de 15 à 10 puis 5 µg/puits), ou après avoir utilisé différentes dilutions de l'AC primaire (1/2000, 1/4 000, 1/8 000 et 1/12 000). La figure 37 représente une membrane caractéristique de celles obtenues lors de ces différentes mises au point.

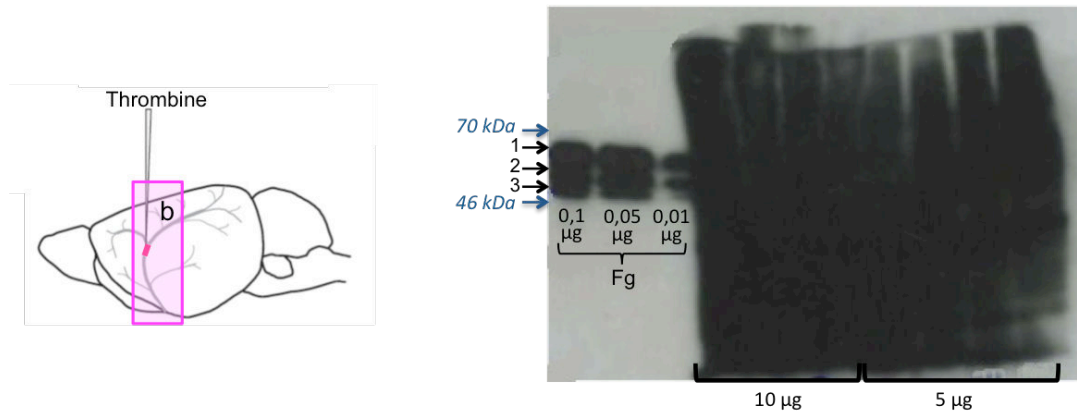


Figure 37 : Membrane représentative des premiers essais de Western blot de fibrine

Le Western blot de fibrine a été réalisé à partir d'homogénats de cerveaux de souris naïves et de souris ischémiques euthanasiées 30 minutes après l'ischémie (région b). Du fibrinogène (Fg) humain (0,1, 0,05 ou 0,01 µg) a été utilisé comme témoin positif. Les échantillons ont été déposés à raison de 10 ou 5 µg de protéines/puits ; la détection de la fibrine par l'AC primaire dilué au 1/8 000 a été réalisée par le système de révélation ECL.

Pour les échantillons correspondants au fibrinogène humain, le témoin positif, ces conditions de Western blot ont permis de révéler trois bandes (figure 37, bandes notées 1, 2 et 3), qui correspondraient donc aux trois chaînes du fibrinogène (cf. Rappels bibliographiques, Chapitre I, paragraphe I.1). La première bande (1) qui a migré vers 67 kDa correspond à la chaîne A α (chaîne α + fibrinopeptide A) ; la seconde bande (2) autour de 52 kDa représente la chaîne B β (chaîne β + fibrinopeptide B) ; et la chaîne de plus petite masse moléculaire (3) (48 kDa) est la chaîne γ du fibrinogène.

En conclusion, ces premiers essais de Western blot ont permis de révéler le témoin positif ; en revanche, la forte viscosité de nos échantillons a gêné la détection de la fibrine.

Nous avons donc apporté quelques modifications au protocole de broyage et d'extraction :

- dès le premier tampon de broyage, nous avons ajouté de puissants inhibiteurs de sérine-protéases (aprotinine, acide ϵ -aminocaproïque, phénylméthylsulfonyl fluoride). Ces inhibiteurs sont en particulier des inhibiteurs de plasmine car cette dernière risquerait de cliver et dégrader le réseau de fibrine dans les échantillons,

- nous avons augmenté la concentration d'urée afin de faciliter la dissociation du réseau de fibrine (de 3 M à 6 M),
- le culot obtenu en fin de broyage a été resuspendu dans le double de tampon réducteur-dénaturant (200 µl contre 100 µl précédemment),
- les échantillons ont été chauffés plus intensément en présence du tampon réducteur-dénaturant (90°C pendant 15 minutes au lieu de 65°C durant 10 minutes).

Une nouvelle série d'échantillons a donc été préparée (souris naïves n=2, souris ischémisées euthanasiées à 30 minutes n=3). Les modifications apportées à l'étape du broyage et d'extraction ont permis d'améliorer nettement la qualité du Western blot. Les échantillons n'étant plus visqueux, leur migration s'est produite sans difficulté et des bandes ont été détectées (figure 38.A). Enfin, en absence d'AC primaire, ces bandes ont disparu (figure 38.B), ce qui a confirmé la spécificité du signal. Les trois bandes du témoin positif (α , β et γ) ont de nouveau été retrouvées.

Concernant les échantillons, la chaîne α n'apparaît pas vers 60 kDa car comme nous l'avons vu ci-dessus, cette chaîne forme des dimères lors de la formation de la fibrine, et ces dimères sont détectés à une masse moléculaire double de celle de la chaîne α seule.

La bande apparaissant au niveau de la masse moléculaire de la chaîne β (52 kDa) n'est présente que chez les souris ischémisées. Cette bande est de forte intensité dans la région b qui correspond à la région de la bifurcation de l'ACM (lieu d'injection de la thrombine), et de plus faible intensité à distance du caillot, c'est-à-dire en zone c. Cette bande correspond donc à la chaîne β de la fibrine, et elle reflète bien la quantité de fibrine de nos échantillons.

La bande qui a migré au même endroit que la chaîne γ du fibrinogène est présente chez tous les animaux (naïfs et ischémisés) et son signal semble être constant quel que soit le groupe. Notons que la présence de cette bande est surprenante puisque normalement, au cours de la maturation de la fibrine, la chaîne γ forme elle aussi des dimères. Cette bande est pourtant spécifique de l'AC primaire car elle disparaît en son absence.

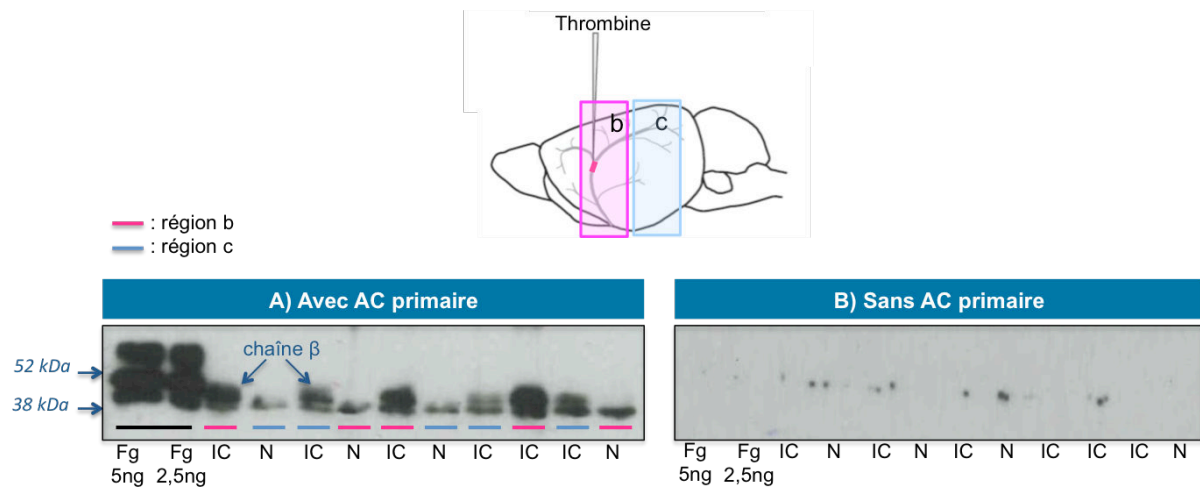


Figure 38 : Détection de la fibrine par Western blot 30 minutes après l'ischémie, au niveau de la zone d'injection de thrombine (région b) et en périphérie (région c)

A : Après avoir déposé 5 µg de protéines/puits, la détection de la fibrine par l'AC primaire dilué au 1/8 000 a été réalisée par le système de révélation ECL. Du fibrinogène humain (2,5 et 5 ng) a été utilisé comme témoin positif. B : La spécificité des signaux a été confirmée lors de l'incubation des membranes en l'absence d'AC primaire. Fg : fibrinogène, N : souris naïves, IC : souris ischémisées.

Afin de mieux séparer la bande de la chaîne β par rapport à la bande située juste en dessous, nous avons modifié la concentration du gel de migration de polyacrylamide (10% \Rightarrow 7,5%) et augmenté la durée de migration. De plus, afin de faciliter la quantification des signaux, le système de révélation ECF a été utilisé. Nous avons alors remarqué que la chaîne β pouvait parfois apparaître sous la forme d'un doublet (figure 39). Lorsque la fibrine se forme à partir du fibrinogène, il est possible que certaines chaînes β ne soient pas clivées au niveau de leur fibrinopeptide B. Le doublet pourrait donc correspondre aux chaînes β et $B\beta$. Pour la suite de notre étude, nous avons pris en compte ce doublet de chaînes pour la quantification.

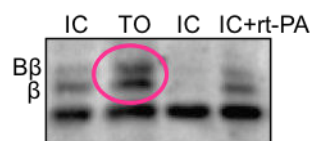


Figure 39 : Détection de la chaîne β de la fibrine sous la forme d'un doublet

IC : souris ischémisées, TO : souris témoins-opérées

Après avoir validé la technique de détection de la fibrine, nous avons donc étudié l'effet de l'ischémie et du rt-PA sur l'expression de la fibrine à 24 heures. Le rt-PA a été administré à la dose de 0,9 mg/kg qui correspond à la dose clinique, et à 10 mg/kg qui est la dose plus couramment utilisée en préclinique.

b) Effet de l'ischémie et du rt-PA sur les dépôts de fibrine à 24 heures

➤ Protocole expérimental

L'évaluation de l'expression de la fibrine a été réalisée sur les homogénats de cerveaux appartenant aux 7 groupes d'animaux suivants (n = 5-7/groupe):

- souris naïves
- souris témoins-opérées
- souris ischémisées
- souris ischémisées traitées par le rt-PA à la dose de 0,9 mg/kg
- souris ischémisées traitées par le rt-PA à la dose de 10 mg/kg

Les animaux ont été euthanasiés 24 heures après la chirurgie et les 3 régions cérébrales ont été prélevées afin de réaliser le Western blot de fibrine : la région b pour le cœur de la lésion et les régions a et c pour la périphérie.

➤ Résultats

La figure 40 présente les images des Western blot ainsi que leur quantification.

Nous avons tout d'abord constaté pour la région b, une très grande dispersion des résultats chez les souris ischémisées traitées par le rt-PA (0,9 et 10 mg/kg) ou par son solvant. L'analyse statistique des résultats (Anova à 2 facteurs) a ensuite indiqué qu'il n'existe pas d'effet groupe, bien que la significativité soit inférieure à 10% ($P=0,08$). En revanche, il existe un effet région ($P<0,01$).

Au sein de chaque groupe, une seconde analyse a été réalisée (test de Bonferroni corrigé) : chez les souris ischémisées, la quantité de fibrine présente en région b tend à être plus importante que celle en région c ($P=0,059$). Les souris ischémisées et traitées par 0,9 mg/kg de rt-PA ont significativement plus de fibrine en région b qu'en région c ($P<0,05$). Pour les autres groupes d'animaux (souris naïves, témoins-opérées, ischémisées traitées par 10 mg/kg de rt-PA), les quantités de fibrine des régions a, b et c ne diffèrent pas significativement.

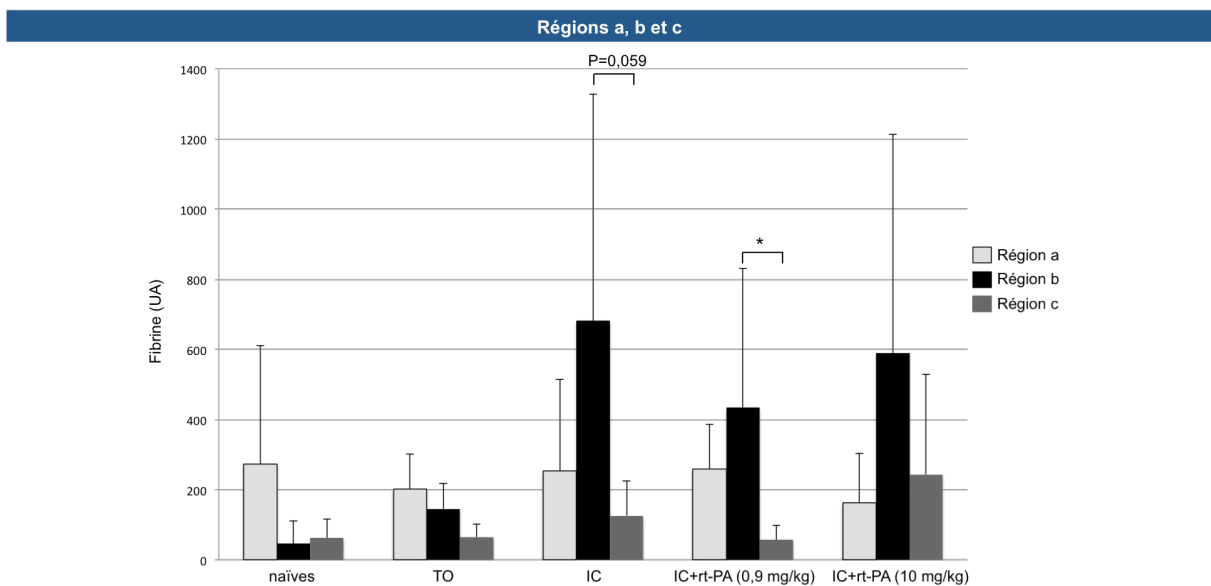
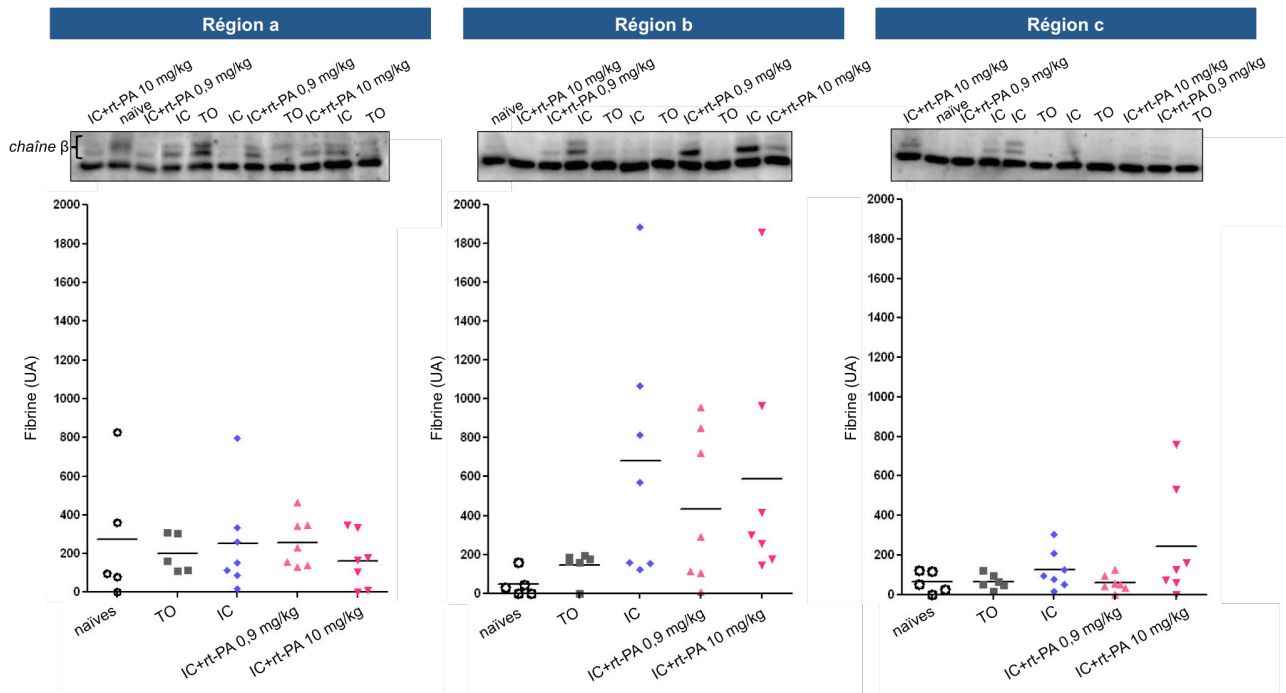


Figure 40 : Effet de l'ischémie et du rt-PA sur les dépôts de fibrine évalués à 24 heures par Western blot

Le rt-PA a été administré à la dose de 0,9 ou 10 mg/kg par voie intraveineuse. Le Western blot de fibrine a été réalisé à partir d'homogénats de cerveaux au niveau des régions a, b et c. Les résultats (moyennes \pm sd) sont exprimés en unités arbitraires (UA). $n=5-7$ /groupe. * : $P<0,05$. TO : souris témoins-opérées, IC : souris ischémiques.

Nous avons ensuite étudié le rôle de la PARP dans la présence de fibrine après un traitement par le rt-PA. Pour cela, nous avons sélectionné la région b, région contenant la plus grande quantité de fibrine à 24 heures, et la dose de 0,9 mg/kg de rt-PA.

c) Étude du rôle de la PARP dans la présence des dépôts de fibrine 24 heures après l'ischémie et après traitement par le rt-PA

➤ Protocole expérimental

Le rt-PA a été administré à la dose de 0,9 mg/kg 4 heures après l'ischémie. Les animaux traités par le PJ34 à la dose de 3 mg/kg ont reçu soit 1 administration (x1) 3 heures après l'ischémie, soit 2 administrations (x2) au moment de l'ischémie et 3 heures après. Les animaux ont donc été répartis ainsi (n= 8-11/groupe) :

- souris témoins-opérées
- souris ischémiées
- souris ischémiées traitées par le rt-PA
- souris ischémiées traitées par le PJ34 (x2)
- souris ischémiées traitées par le rt-PA + PJ34 (x1)
- souris ischémiées traitées par le rt-PA + PJ34 (x2)

Les animaux ont été euthanasiés 24 heures après la chirurgie et la région b du cœur de la lésion a été prélevée pour l'étude par Western blot de la présence de fibrine.

➤ Résultats

L'analyse statistique indique qu'il n'existe pas de différence significative entre les groupes bien que l'on note une augmentation de 34% de la quantité de fibrine 24 heures après l'ischémie (figure 41). Ainsi, le rt-PA ne modifie pas les taux post-ischémiques de fibrine, et le PJ34 seul ou associé au rt-PA n'entraîne aucune modification.

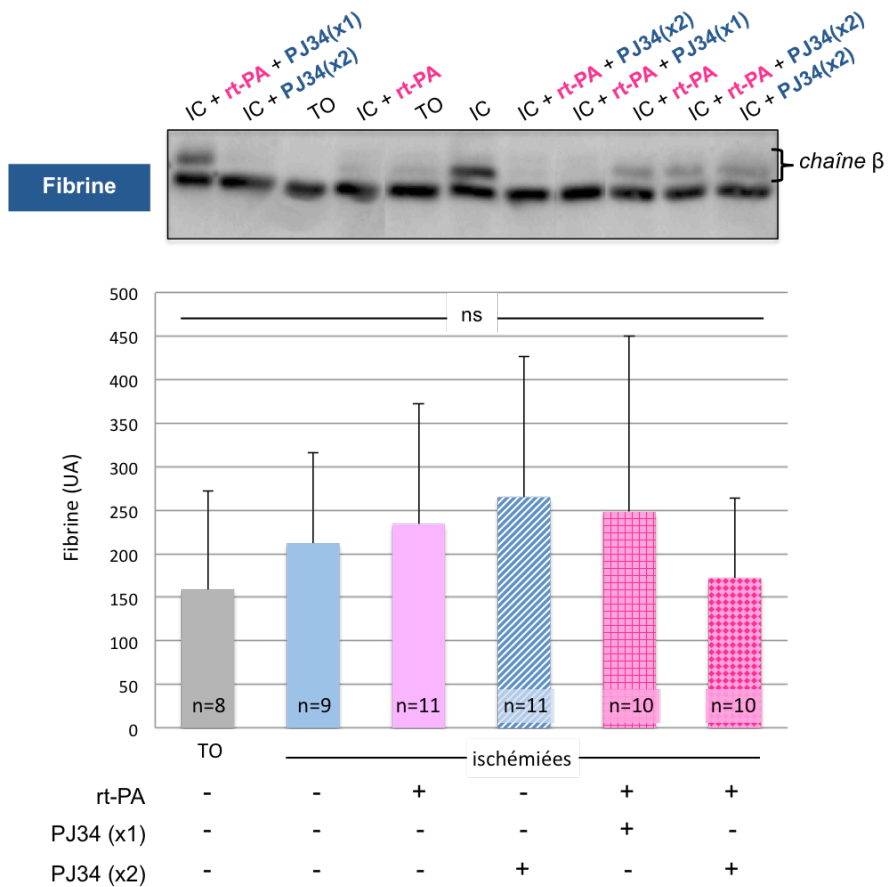


Figure 41 : Effet du rt-PA et du PJ34 sur la présence de dépôts de fibrine évaluée par Western blot 24 heures après une ischémie cérébrale

Le rt-PA a été administré à la dose de 0,9 mg/kg. Les souris traitées par le PJ34 (3 mg/kg) ont reçu 2 injections (X2) i.e. au moment de l'ischémie et 3 heures après, ou 1 seule injection (x1) à 3 heures. Le Western blot de fibrine a été réalisé au niveau de la région b. Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en unités arbitraires (UA). TO : souris témoins-opérées, IC : souris ischémisées, ns : non significatif.

d) Discussion

A la suite d'une thrombolyse par le rt-PA en clinique, la qualité de la reperfusion semble particulièrement hétérogène selon les patients (An et al., 2011). Dans les heures qui suivent l'administration de rt-PA, la reperfusion du tissu peut n'être que partielle, ce qui a d'ailleurs été retrouvé *in vivo* dans notre modèle d'ischémie (El Amki et al., 2012). D'autre part, la recanalisation peut être suivie en clinique d'une réocclusion du vaisseau dans 20 à 30% des cas (Saqgur et al., 2007a; Rubiera et al., 2005; Alexandrov et Grotta, 2002).

Au vu de ces données cliniques, nous avons recherché si ces phénomènes sont liés à une augmentation par le rt-PA des dépôts de fibrine, qui pourraient participer à l'obstruction des microvaisseaux. En effet, il a été montré expérimentalement que d'une part, en fragmentant le caillot à l'origine de l'ischémie, le rt-PA pouvait favoriser la présence de microthrombi secondaires en aval du site de l'occlusion (Jiang et al., 2000). D'autre part, des études ont montré que le rt-PA est capable de perturber le système de coagulation et de favoriser la formation *in situ* de fibrine (voir Rappels bibliographiques, Chapitre III, paragraphe III 2.b.).

La présence des dépôts de fibrine a été évaluée par Western blot, technique dont la mise au point a été délicate à élaborer en raison de la complexité structurale de la fibrine.

Lors d'une première expérience, nous avons étudié à 24 heures l'effet de l'ischémie et du traitement non seulement par la faible dose de rt-PA (0,9 mg/kg) qui correspond à la dose utilisée en clinique, mais également par la forte dose (10 mg/kg) plus couramment utilisée en recherche préclinique. Le taux de fibrine a été évalué au niveau du cortex ipsilatéral dans les trois régions du cerveau : dans le cœur de la lésion et dans les deux régions adjacentes.

- ❖ Nos résultats montrent que dans **les deux régions en périphérie**, la fibrine semble présente en faible quantité ; ni la chirurgie, ni l'ischémie, ni même l'administration de rt-PA (0,9 ou 10 mg/kg) ne modifient les taux de fibrine dans ces régions.
- ❖ En revanche, la quantité de fibrine est différente dans **la région du cœur**, dans laquelle se trouve le site d'injection de la thrombine. Toutefois, **en raison notamment d'une grande dispersion des valeurs chez les animaux ischémiés traités ou non par le rt-PA, l'analyse statistique n'a pas permis de conclure quant aux effets de l'ischémie et/ou du rt-PA (0,9 ou 10 mg/kg).**

Bien qu'à 30 minutes nos résultats ont confirmé ceux de Orset et al. (2007) et ont montré la présence d'un thrombus riche en fibrine dans la lumière de l'artère, nous ignorions au moment de commencer cette étude, l'avenir de ce thrombus à 24 heures.

Parmi les souris ischémisées, nos résultats suggèrent l'existence de deux populations distinctes d'animaux à 24 heures. Certains animaux ischémisés présentent des taux faibles de fibrine. La fibrinolyse endogène semble avoir été suffisante pour lyser le thrombus à 24 heures. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Gauberti et al. (2014) qui ont montré par IRM que 24 heures après l'ischémie dans ce même modèle, la reperfusion induite par la fibrinolyse endogène est stable et complète chez tous les animaux inclus dans l'étude. Cette équipe montre que contrairement à des modèles d'ischémie par occlusion mécanique transitoire, le modèle par injection de thrombine n'est pas à l'origine de microthrombi secondaires à 24 heures.

Néanmoins, nous avons également observé dans notre étude l'existence d'une deuxième population d'animaux qui présente des taux plus élevés de fibrine. Nous ne pouvons donc exclure que ces souris ischémisées sont peut être, à l'inverse, des animaux chez lesquels le thrombus est resté en place dans l'ACM ou bien chez lesquels se sont additionnés des dépôts de fibrine après activation post-ischémique de la coagulation.

Concernant l'effet du rt-PA, pour certains animaux, les faibles taux de fibrine suggèrent une thrombolyse efficace. A l'inverse, les animaux qui présentent des taux plus élevés de fibrine peuvent être :

- soit des animaux chez lesquels le thrombus est resté en place dans l'ACM, ce qui indiquerait un manque d'efficacité du rt-PA. Rappelons qu'il a d'ailleurs été montré dans ce même modèle d'ischémie qu'une administration tardive de rt-PA (0,9 ou 10 mg/kg) induit une reperfusion lente et partielle, puisque 2 heures après l'administration, le DSC reste inférieur à 40% de sa valeur initiale (El Amki et al., 2012),
- soit des animaux chez lesquels se sont produits des phénomènes de réocclusion.

Au cours d'une seconde étude, nous avons examiné l'effet du PJ34, l'inhibiteur de la PARP. Il a en effet été montré au laboratoire que le PJ34 améliore la reperfusion induite par le rt-PA (0,9 mg/kg) dans les heures qui suivent l'injection de thrombine (El Amki et al., en préparation). Nous avons donc recherché si à 24 heures, le PJ34 exerce un effet protecteur au niveau des vaisseaux en diminuant les phénomènes de réocclusion, ou si ce dernier améliore l'activité thrombolytique du rt-PA. Pour cela, les dépôts de fibrine ont été évalués dans le cœur de la lésion en région b. **Nos travaux n'ont pas mis en évidence d'effet protecteur du PJ34.**

Au vu de ces résultats peu concluant, il nous faudra compléter cette étude à l'aide d'une autre technique permettant de rechercher plus finement la présence de fibrine, et de distinguer la fibrine présente dans la lumière des macrovaisseaux tels que l'ACM, de celle formée au niveau des microvaisseaux. Pour cela, il sera intéressant de réaliser en immunohistochimie sur des coupes de

cerveaux, un co-marquage de la fibrine et des cellules endothéliales. D'autre part, il nous faudra compléter ces travaux en étudiant la perfusion cérébrale par un marquage au dextran-FITC ou par microscopie intravitale, ce qui nous permettra de mettre en évidence les régions d'hypoperfusion 24 heures après l'ischémie mais également à des temps plus précoces.

Après avoir recherché l'effet du rt-PA sur la présence de dépôts de fibrine utilisés comme marqueur vasculaire de thrombose, nous avons poursuivi l'étude des altérations vasculaires induites par le rt-PA grâce à des marqueurs exprimés en particulier par l'endothélium.

III. Évaluation des atteintes endothéliales induites par le rt-PA après une ischémie cérébrale

Afin d'évaluer les effets de l'ischémie cérébrale et du rt-PA sur l'endothélium, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à des marqueurs d'inflammation, VCAM-1 et ICAM-1, grâce à des techniques de Western blot et d'immunohistochimie (IHC). Dans un second temps, nous avons recherché la présence de microparticules endothéliales, marqueurs de dysfonction endothéliale.

1. Étude de l'expression de VCAM-1

a) Effet de l'ischémie et du rt-PA sur l'expression de VCAM-1 évaluée par Western blot

➤ Protocole expérimental

Nous avons souhaité étudier l'expression de VCAM-1 6 heures et 24 heures après l'ischémie ainsi que l'effet du rt-PA administré à la dose de 0,9 mg/kg. Les animaux ont donc été répartis en 7 groupes :

- souris naïves
- souris témoins-opérées euthanasiées à 6 heures ou à 24 heures
- souris ischémiées euthanasiées à 6 heures ou à 24 heures
- souris ischémiées traitées par le rt-PA (0,9 mg/kg) euthanasiées à 6 heures ou à 24 heures

L'expression de VCAM-1 a été évaluée dans la région b, qui correspond au cœur de la lésion. VCAM-1 est une protéine détectée par Western blot autour de 100 kDa. La quantification de cette protéine a été rapportée à celle de l'actine comme protéine de référence.

➤ Résultats

La figure 42.A illustre un exemple de membrane obtenue en utilisant un anticorps (AC) anti-VCAM-1 (Santa Cruz, n°1) avec lequel une seule bande a été observée aux environs de la masse moléculaire de la protéine. En l'absence de cet AC primaire, la bande a disparu (résultat non représenté), ce qui a permis de confirmer la spécificité du signal. La figure 42.B présente les résultats de la quantification de la bande d'intérêt. Quel que soit le temps (6 heures ou 24 heures), nous n'avons noté aucune modulation de l'expression de VCAM-1, que ce soit par la chirurgie (souris témoins-opérées *versus* souris naïves), par l'ischémie (souris ischémisées *versus* témoins-opérées) ou par l'administration de rt-PA (souris ischémisées traitées par le rt-PA *versus* souris ischémisées traitées par son solvant).

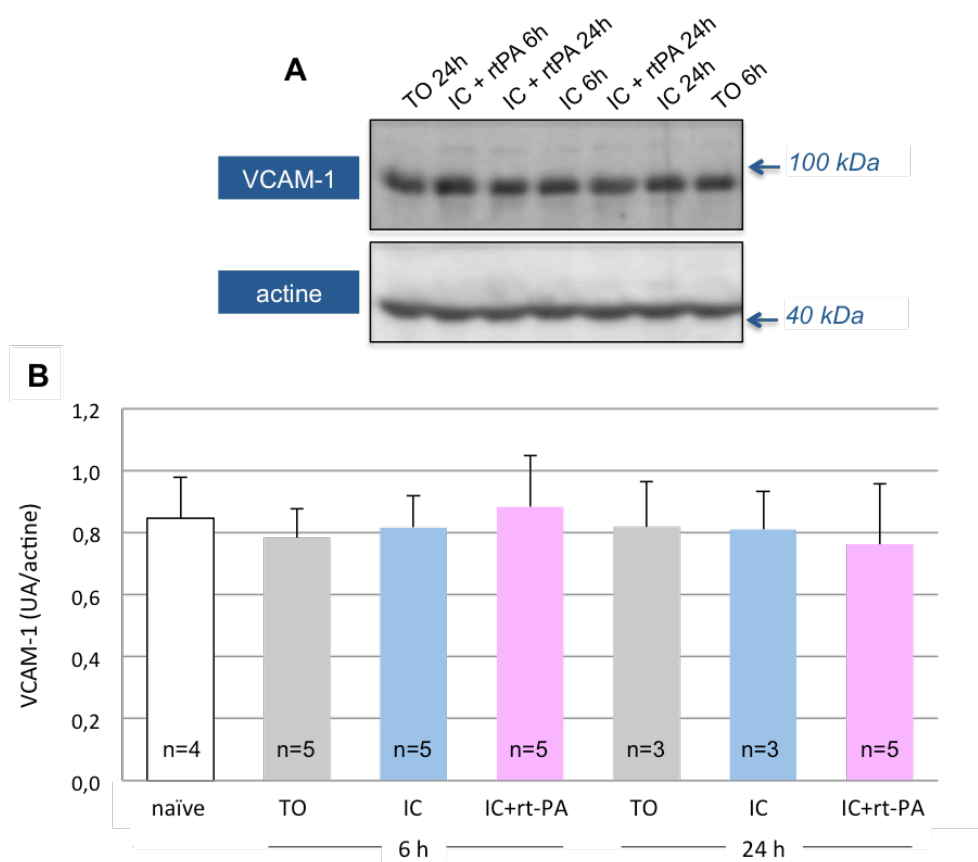


Figure 42 : Effet de l'ischémie et du rt-PA (0,9 mg/kg) sur l'expression de VCAM-1 évaluée à 6 heures et 24 heures par Western blot

A : Western blot représentatif obtenu avec l'AC anti-VCAM-1 n°1 ; le Western blot de l'actine a également été réalisé sur les mêmes membranes. B : Quantification du Western blot. Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en unités arbitraires (UA) et sont rapportés à l'actine. TO : souris témoins-opérées, IC : souris ischémisées.

Au vu de ces résultats négatifs, nous avons souhaité confirmer cette étude avec un autre AC primaire anti-VCAM-1 (Abcam, n°2). Cet AC a donné les mêmes résultats en Western blot : une seule bande autour de 100 kDa qui, après quantification, ne montre aucune modulation, ni par l'ischémie, ni par l'administration de rt-PA (résultats non présentés).

Nous avons ensuite choisi de compléter cette étude par l'utilisation d'une autre technique : l'immunohistochimie (IHC). Nous avons également étudié l'implication de la PARP dans l'expression de VCAM-1.

b) Effet de l'ischémie et du rt-PA sur l'expression de VCAM-1 évaluée par IHC : étude du rôle de la PARP

➤ **Expression de VCAM-1 24 heures après l'ischémie cérébrale**

▪ **Protocole expérimental**

Nous avons réalisé une première expérience afin de valider d'une part le protocole de marquage de VCAM-1 par un AC anti-VCAM-1 différent de ceux utilisés en Western blot ; la révélation du marquage a été réalisée par la DAB. D'autre part, nous avons étudié l'effet de la chirurgie et de l'ischémie à 24 heures sur l'expression de VCAM-1 (n= 4-7/groupe).

La quantification du marquage cortical a été réalisée dans les régions du cœur et de la bordure (voir Matériel et Méthodes, paragraphe V.2.b) ; la surface du marquage est exprimée en pixels.

▪ **Résultats**

Les photos de la figure 43 sont représentatives du marquage obtenu.

Les souris naïves et témoins-opérées ne présentent pas ou très peu de marquage. En revanche, 24 heures après l'ischémie, le cortex ipsilatéral des souris ischémisées est riche en marquage de type vasculaire localisé au niveau de la lésion.



Figure 43 : Photos représentatives de l'expression de VCAM-1 dans le cortex ipsilatéral à 24 heures

La quantification du marquage a confirmé ces résultats qualitatifs (figure 44). En effet, en ce qui concerne le marquage total (*i.e.* dans le cœur et en bordure de la lésion), les souris témoins-opérées n'expriment pas plus VCAM-1 que les souris naïves (figure 44.A). En revanche, l'ischémie augmente de 4,4 fois l'expression de VCAM-1 : $26\,291 \pm 17\,171$ pixels *versus* $6\,002 \pm 3\,510$ pixels pour les souris témoins-opérées ($P < 0,05$) (figure 44.A). La protéine VCAM-1 est principalement exprimée à l'avant du cerveau, entre les niveaux 2 et 6 (figure 44.B). L'augmentation significative de l'expression de VCAM-1 est liée à la fois à une augmentation dans le cœur de la lésion ($P < 0,01$; figure 44.C) et en bordure de la zone infarctée ($P < 0,05$; figure 44.D). Pour chaque groupe d'animaux, VCAM-1 est autant exprimé en région cœur qu'en région bordure (d'après le test statistique de Wilcoxon).

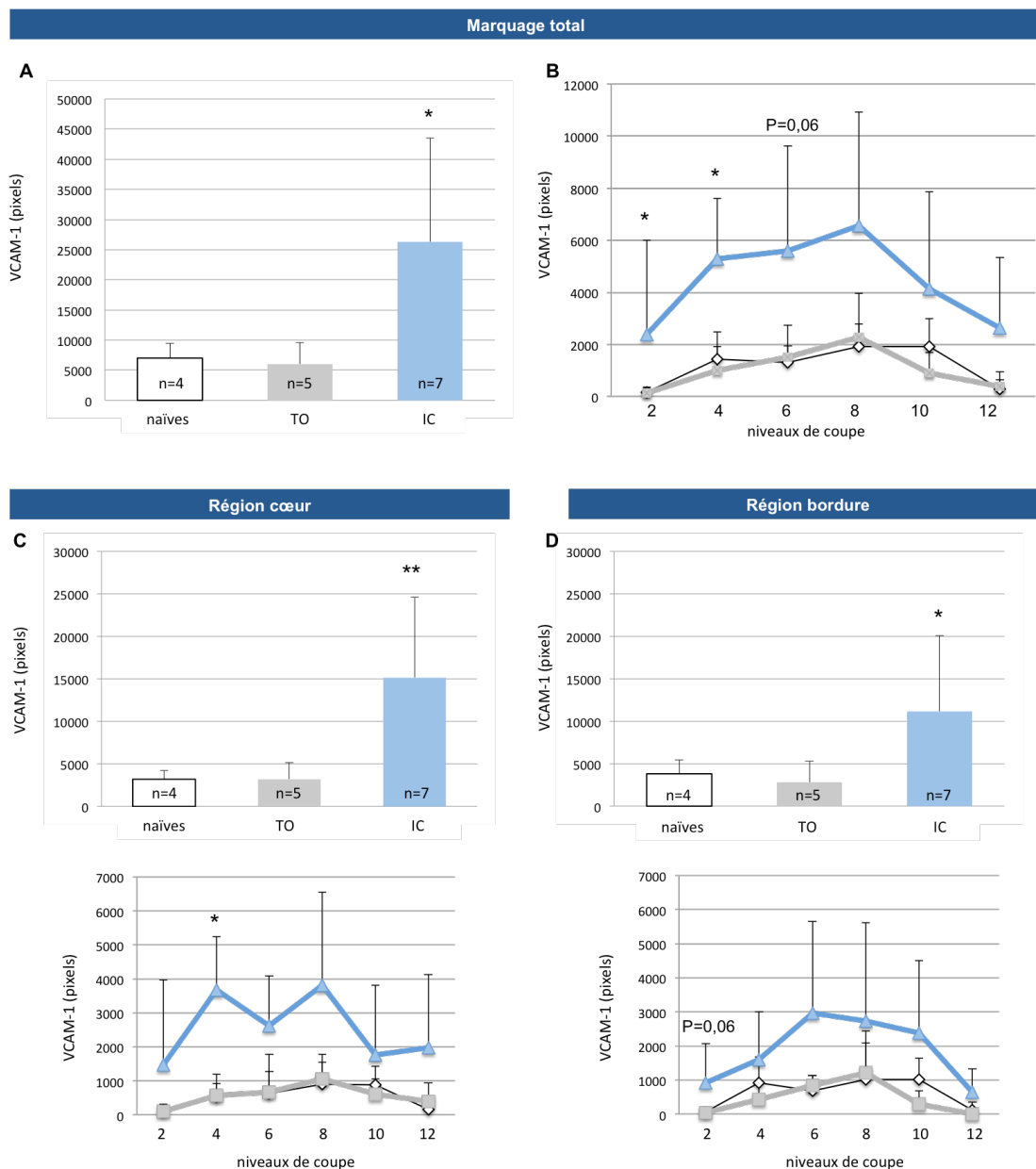


Figure 44 : Évaluation de l'expression de VCAM-1 par HIC, 24 heures après l'ischémie

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sd. * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ versus souris témoins-opérées ; $P = 0,06$: souris ischémisées versus souris témoins-opérées. TO : souris témoins-opérées, IC : souris ischémisées.

Après avoir montré que l'ischémie est à l'origine d'une augmentation de l'expression de VCAM-1 à 24 heures, nous nous sommes intéressés à l'effet du rt-PA et au rôle de la PARP dans l'expression post-ischémique de cette protéine.

➤ **Effet du rt-PA et rôle de la PARP dans l'expression de VCAM-1**

▪ **Protocole expérimental**

Le rt-PA a été administré à la dose de 0,9 mg/kg. Le PJ34 (3 mg/kg) a été administré soit 2 fois (x2) *i.e.* au moment de l'ischémie et 3 heures après, soit une seule fois (x1) *i.e.* 3 heures après l'ischémie.

Les animaux ont donc été répartis en 6 groupes et euthanasiés à 24 heures (n= 5-10/groupe):

- souris témoins-opérées
- souris ischémisées
- souris ischémisées traitées par le rt-PA
- souris ischémisées traitées par le rt-PA et le PJ34 (x1)
- souris ischémisées traitées par le rt-PA et le PJ34 (x2)
- souris ischémisées traitées le PJ34 (x2)

Les expériences antérieures ayant mis en évidence un profil d'expression de VCAM-1 similaire entre le cœur et la bordure de la lésion, la surface de marquage a été analysée pour la région d'intérêt totale.

▪ **Résultats**

Nous avons constaté sur les coupes de cerveaux de souris ischémisées un marquage de type vasculaire similaire à celui obtenu lors de l'expérience précédente et localisé majoritairement au niveau de la zone lésée. Les résultats de la quantification sont présentés sur la figure 45.

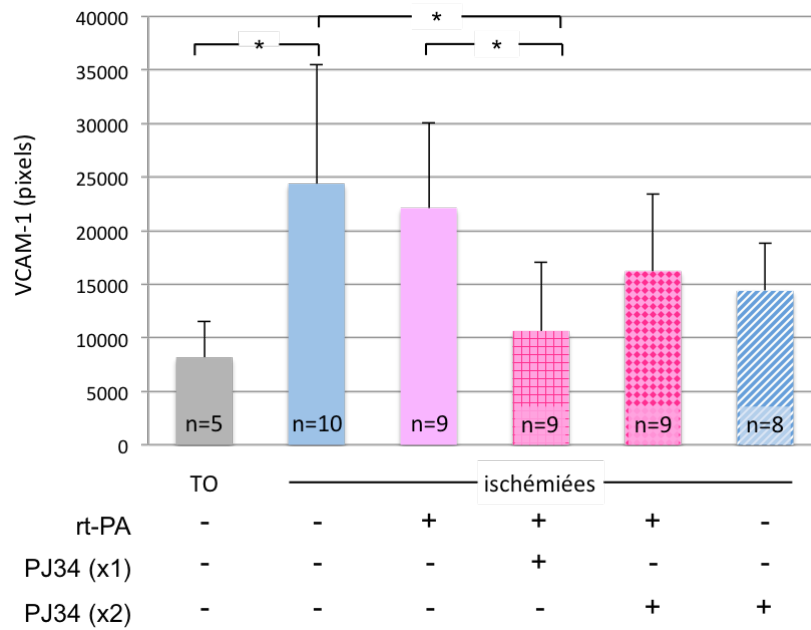


Figure 45 : Effet du rt-PA et rôle de la PARP dans l'expression de VCAM-1 24 heures après l'ischémie

Le rt-PA a été administré à la dose de 0,9 mg/kg. Les souris traitées par le PJ34 (3 mg/kg) ont reçu 2 injections (x2) i.e. au moment de l'ischémie et 3 heures après, ou bien 1 seule injection (x1) à 3 heures. La quantification de la surface de marquage a été réalisée au niveau du cortex ipsilatéral (région cœur + bordure). Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en pixels. * : $P < 0,05$. TO : souris témoins-opérées, IC : souris ischémiées.

Nous avons confirmé que l'ischémie est à l'origine d'une augmentation significative de l'expression de VCAM-1 à 24 heures (souris ischémiées : $24\,391 \pm 11\,109$ pixels *versus* souris témoins-opérées : $8\,179 \pm 3\,334$ pixels; $P < 0,05$). En revanche, l'administration de rt-PA ne modifie pas l'expression post-ischémique de VCAM-1. De manière intéressante, l'association d'une seule administration de PJ34 au rt-PA permet de diminuer l'expression de VCAM-1 de 56% par rapport aux souris ischémiées ($P < 0,05$) et de 52% par rapport aux souris ischémiées traitées le rt-PA ($P < 0,05$). En revanche, lorsque le PJ34 est administré deux fois, il perd son effet protecteur.

Notons que le PJ34 administré seul (x2) aux animaux ischémiés ne modifie pas l'expression post-ischémique de VCAM-1 ($P = 0,14$).

c) Discussion

Afin de préciser les effets délétères de l'ischémie et du rt-PA sur l'endothélium vasculaire, nous nous sommes intéressés au cours de cette étude à l'expression de VCAM-1, marqueur d'atteinte endothéliale et d'inflammation. En effet, VCAM-1 est une molécule dont l'expression par les cellules endothéliales est augmentée dans un contexte inflammatoire ; cette molécule participe à l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium.

Rappelons que bien que le rt-PA soit couramment utilisé à la dose de 10 mg/kg en recherche préclinique, nous avons choisi d'étudier la dose de 0,9 mg/kg qui correspond à la dose utilisée en clinique. Celle-ci entraîne dans le modèle d'ischémie par injection de thrombine des effets délétères similaires à ceux induits par la dose de 10 mg/kg, notamment en terme de survenue de TH (El Amki et al., 2012).

L'expression de VCAM-1 a tout d'abord été évaluée par Western blot 6 heures et 24 heures après l'ischémie au niveau du cœur de la lésion, zone dans laquelle les cellules sont le plus en souffrance. Néanmoins, nous n'avons observé aucune modification de l'expression de VCAM-1 après l'ischémie, et le rt-PA s'est également révélé sans effet.

Nous avons ensuite complété ces travaux par une étude par IHC à 24 heures. En effet, contrairement au Western blot, l'IHC permet de repérer finement le marquage et de visualiser sa répartition au niveau des structures cérébrales.

Grâce à cette technique, nous avons pu mettre en évidence que **l'ischémie est à l'origine d'une augmentation significative de l'expression de VCAM-1 à 24 heures**, à la fois dans le cœur de la lésion mais également en bordure. Cette augmentation n'est pas attribuable à l'effet de la chirurgie puisque les souris témoins-opérées ne présentent pas plus de marquage que les souris naïves. Nos travaux sont à rapprocher de ceux de Gauberti et al. (2013) qui, dans le même modèle d'ischémie par injection de thrombine, ont évalué la cinétique d'expression de VCAM-1 par IRM. De manière intéressante, cette équipe a observé une augmentation post-ischémique de VCAM-1 entre 24 heures et 5 jours, avec un maximum à 24 heures. Il est important de souligner que cette augmentation post-ischémique de VCAM-1 à 24 heures a aussi été mise en évidence dans d'autres modèles d'ischémie (Fréchou et al., 2013; Justicia et al., 2006). Chez l'homme, il a également été rapporté une augmentation post-ischémique, tant au niveau de la forme membranaire de VCAM-1 (Blann et al., 1999) que de sa forme soluble (Selaković et al., 2003; Bitsch et al., 1998).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet du rt-PA sur l'expression post-ischémique de VCAM-1. Il s'avère que le modèle d'ischémie cérébrale par injection de thrombine est un bon modèle pour l'étude de la toxicité vasculaire du rt-PA puisque l'administration tardive de rt-PA (entre 3 et 4 heures) entraîne une aggravation des TH *via* une atteinte de la BHE (El Amki et al., 2012; García-Yébenes et al., 2011; El Amki et al., en préparation). Nous avons donc recherché si cette toxicité vasculaire se traduisait également par une augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1.

Nos résultats montrent qu'à **24 heures, le rt-PA ne modifie pas l'expression post-ischémique de VCAM-1**. A notre connaissance, seules deux études ont recherché l'effet du rt-PA sur VCAM-1. Les travaux de Miyazaki et al. (2011) ont montré que le rt-PA entraîne 24 heures après l'ischémie une augmentation de VCAM-1, qui est associée à une augmentation de l'adhésion leucocytaire. Ces travaux, qui ne sont donc pas en accord avec nos résultats, présentent toutefois des différences avec notre étude:

- VCAM-1 a été évaluée non pas au niveau de l'expression de la protéine mais de son ARNm,
- le modèle d'ischémie n'est pas un modèle par injection de thrombine mais par photothrombose,
- le rt-PA a été administré non pas à 0,9 mg/kg mais à la dose de 10 mg/kg.

Néanmoins, la parution très récente de l'étude menée par Lenglet et al. (2014a) contredit de nouveau ces résultats puisque cette équipe a montré que la forte dose de rt-PA (10 mg/kg) ne modifie pas les taux d'ARNm de VCAM-1 au cours des 3 jours qui suivent une ischémie cérébrale transitoire (occlusion endovasculaire de l'ACM par un filament).

Ainsi, l'effet du rt-PA sur l'expression de VCAM-1 à la suite d'une ischémie cérébrale semble à l'heure actuelle encore controversé et nécessiterait de plus amples investigations.

Des études ont montré que la PARP, par activation de certains facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1, augmente l'expression des molécules d'adhésion (Xu et al., 2014). La dernière étape de notre étude a donc consisté à rechercher l'implication de la PARP dans l'expression de VCAM-1 dans nos conditions expérimentales. Pour cela, nous avons utilisé un puissant inhibiteur de PARP, le PJ34. Le protocole d'administration utilisé (3 mg/kg ; 1 ou 2 injections) est celui élaboré au laboratoire et qui a permis de montrer dans ce même modèle l'effet protecteur du PJ34 vis-à-vis des TH induites par le rt-PA et de la dégradation des protéines de jonction de la BHE (El Amki et al., en préparation).

Nous avons montré qu'à la suite de l'ischémie, l'administration de PJ34 est dénuée d'effet propre protecteur. Ceci pourrait être due à l'utilisation d'une faible dose de PJ34 (3 mg/kg). En effet, l'effet vasculoprotecteur du PJ34, en particulier sur les molécules d'adhésion, a été démontré dans des

modèles d'ischémie cérébrale avec des doses supérieures à 10 mg/kg (Lenzser et al., 2007; Haddad et al., 2006).

En revanche, nos résultats indiquent que **lorsque le PJ34 est associé au rt-PA, il permet de diminuer l'expression post-ischémique de VCAM-1.**

De manière surprenante, alors qu'une simple injection de PJ34 est à l'origine de cet effet protecteur sur VCAM-1 dans nos conditions expérimentales, une double injection ne diminue pas l'expression de VCAM-1. Il a pourtant été montré au laboratoire qu'une double injection s'oppose totalement aux TH induites par le rt-PA et à la dégradation de la BHE. Les raisons d'un tel effet restent à préciser.

Il est intéressant de remarquer que ni le rt-PA, ni le PJ34 ne modifient l'expression post-ischémique de VCAM-1. En revanche, leur association (rt-PA + 1 injection de PJ34) permet de diminuer l'expression de VCAM-1 par rapport aux souris ischémisées et aux souris ischémisées traitées par le rt-PA. Il semblerait que le PJ34 protège de l'inflammation induite par l'ischémie, mais seulement en présence de rt-PA. Notons qu'une étude antérieure réalisée au laboratoire dans le même modèle d'ischémie avait remarqué un effet similaire sur l'œdème cérébral, le volume de lésion et le déficit neurologique : alors que l'administration de rt-PA n'aggrave pas ces trois conséquences post-ischémiques, le PJ34 seul ne protège pas mais leur association (rt-PA+PJ34) réduit ces trois effets délétères (El Amki et al., en préparation). Ceci suggère un effet synergique entre ces deux molécules qui pourrait permettre de diminuer les doses de chacun et leurs effets indésirables.

Au vu des données de la littérature, le rôle délétère de VCAM-1 au cours de l'ischémie cérébrale ne semble pas encore bien précisé. Néanmoins, il a été montré en clinique que des taux élevés de VCAM-1 sont associés à une moins bonne récupération neurologique et à un risque de récurrence plus important (Castillo et al., 2009; Blum et al., 2006; Campbell et al., 2006). Néanmoins, dans notre modèle expérimental, la diminution de VCAM-1 par le PJ34 24 heures après l'ischémie cérébrale n'est pas associée à une diminution des dépôts de fibrine (voir l'étude précédente II.2.c).

2. Étude de l'expression d'ICAM-1

a) Effet de l'ischémie et du rt-PA sur l'expression d'ICAM-1 évaluée par Western blot

➤ Protocole expérimental

L'évaluation de l'expression d'ICAM-1 par Western blot a été réalisée avec les échantillons ayant été utilisés pour les Western blot de VCAM-1. Nous retrouvons donc les 7 mêmes groupes d'animaux (n = 4-8/groupe):

- souris naïves
- souris témoins-opérées euthanasiées à 6 heures ou à 24 heures
- souris ischémisées et euthanasiées à 6 heures ou à 24 heures
- souris ischémisées traitées par le rt-PA (0,9 mg/kg) et euthanasiées à 6 heures ou à 24 heures

L'expression d'ICAM-1 a été évaluée dans la région b. ICAM-1 étant une protéine qui possède différents niveaux de glycosylation, sa masse moléculaire se situe entre 90 et 115 kDa.

➤ Mise au point du Western blot

Un premier essai de Western blot a été réalisé sur quelques échantillons afin de tester un premier AC anti-ICAM-1 provenant de chez Abcam (AC n°1). Un témoin positif, lysat de cellules Raw 264.7, a également été déposé. Comme l'illustre la figure 46, cet AC n'a pas permis de mettre en évidence le témoin positif. Concernant les autres échantillons, une bande de très faible intensité et non quantifiable semble visible aux alentours de 100 kDa.

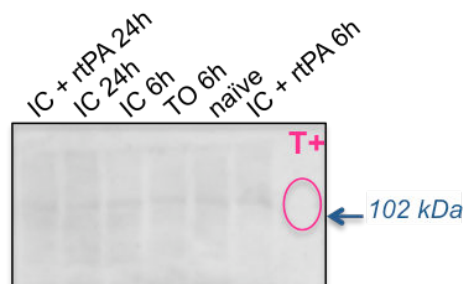


Figure 46 : Mise au point du Western blot d'ICAM-1 (AC anti-ICAM-1 n°1)

T+ : témoin positif

Nous avons donc utilisé un second AC primaire, de chez Santa Cruz (AC n°2). Celui-ci a permis de détecter plusieurs bandes : un signal de très forte intensité à environ 225 kDa donc bien supérieur à la masse moléculaire attendue d'ICAM-1, et trois autres bandes localisées autour de la masse moléculaire de la protéine *i.e.* 100 kDa (figure 47.A). Concernant le témoin positif, ce dernier montre un signal important mais qui se trouve entre 2 des 3 bandes (vers 102 kDa). A l'issue de ce Western blot, il nous était difficile de conclure quant à la spécificité des signaux observés.

Nous avons donc réalisé de nouveau un Western blot en utilisant cette fois-ci le peptide bloquant correspondant à l'AC primaire n°2. De manière surprenante, la membrane incubée en présence du peptide bloquant n'a présenté aucun signal, que ce soit aux alentours de 225 kDa ou de 100 kDa (figure 47.B).

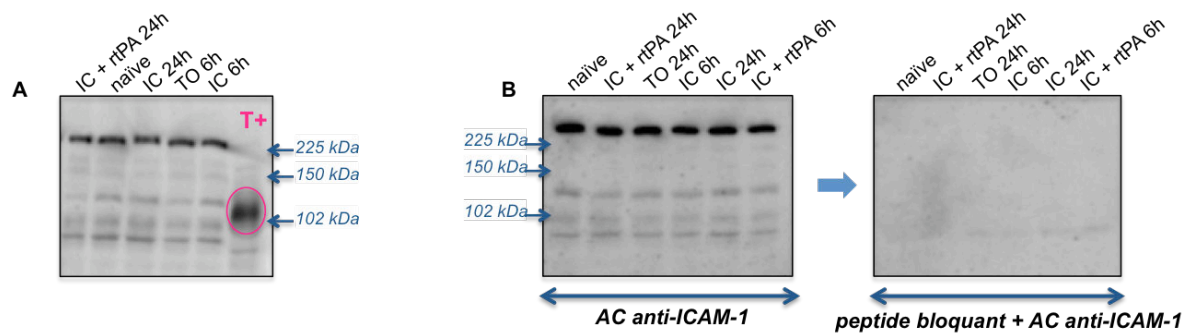


Figure 47 : Mise au point du Western blot d'ICAM-1 (AC anti-ICAM-1 n°2)

L'AC anti-ICAM-1 n°2 a été testé seul (A) ou avec le peptide bloquant correspondant (B). T+ : témoin positif, TO : souris témoins-opérées, IC : souris ischémiées.

Au vu de ces résultats, nous avons finalement décidé de tester un troisième AC anti-ICAM-1 (AC n°3, R&D Systems). La spécificité de cet AC avait été examinée par une doctorante du laboratoire dans un autre modèle d'ischémie cérébrale. Elle avait montré qu'avec cet AC, une large bande était détectable vers 100 kDa, aussi bien au niveau du témoin positif que des échantillons, et ces signaux disparaissaient en l'absence de l'AC primaire. Nous avons donc réalisé le Western blot d'ICAM-1 sur l'ensemble de nos échantillons, et l'actine a également été révélée sur ces mêmes membranes puis quantifiée comme protéine de référence.

➤ Résultats

La figure 48.A présente un exemple de membrane. Nous avons confirmé la présence d'un signal de forte intensité aux alentours de 100 kDa. Les résultats obtenus après quantification sont présentés sur la figure 48.B.

Que ce soit 6 heures ou 24 heures après la chirurgie, les souris témoins-opérées expriment autant ICAM-1 que les souris naïves.

A 6 heures, l'ischémie n'entraîne pas de modification de l'expression de la protéine par rapport aux souris témoins opérées et le rt-PA n'augmente pas non plus son expression.

A 24 heures, l'ischémie ne modifie pas l'expression d'ICAM-1. En revanche, le rt-PA tend à augmenter de 21% l'expression d'ICAM-1 par rapport aux souris ischémiées, mais cet effet n'est statistiquement pas significatif.

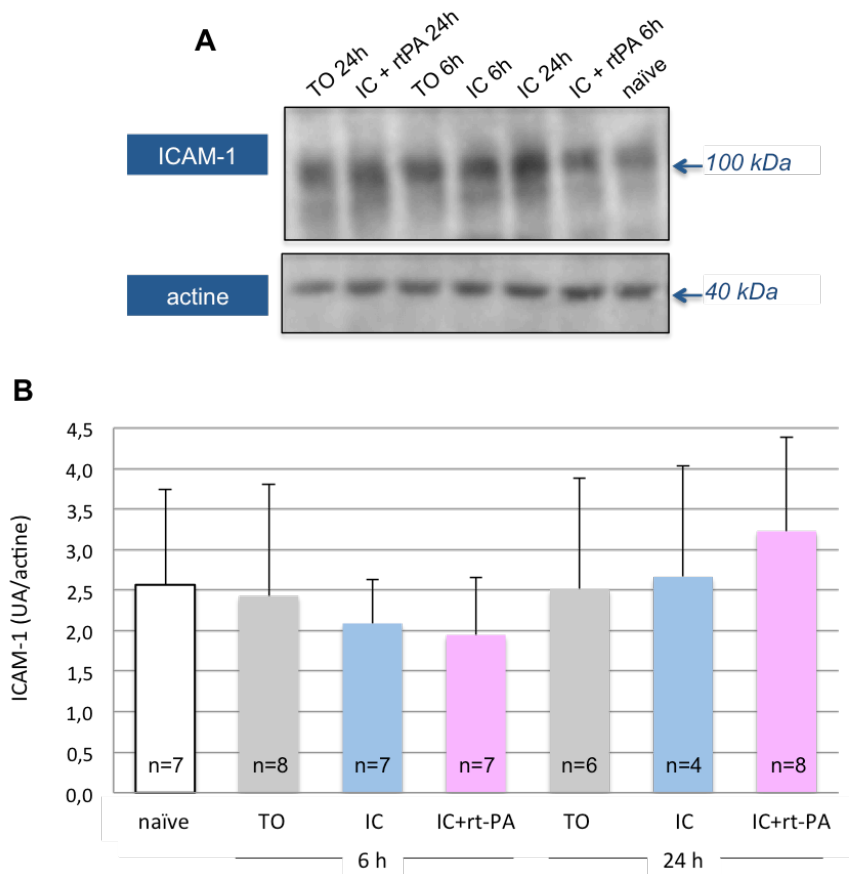


Figure 48 : Effet de l'administration de rt-PA sur l'expression d'ICAM-1 évaluée 6 heures et 24 heures après l'ischémie par Western blot (AC anti-ICAM-1 n°3)

A : L'AC anti-ICAM-1 n°3 a permis d'évaluer l'expression d'ICAM-1 6 heures et 24 heures après l'ischémie et d'étudier l'effet du rt-PA (0,9 mg/kg). Le Western blot de l'actine a également été réalisé sur les mêmes membranes. B : Quantification du Western blot. Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en unités arbitraires (UA) et sont rapportés à l'actine. TO : souris témoins-opérées, IC : souris ischémisées.

Nous avons ensuite complété ces travaux par une étude par IHC à 24 heures. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés non seulement à la dose de 0,9 mg/kg de rt-PA, mais également à la dose plus forte de 10 mg/kg.

b) Effet de l'ischémie et du rt-PA sur l'expression d'ICAM-1 évaluée par IHC

➤ Protocole expérimental

L'expression d'ICAM-1 a été évaluée 24 heures après la chirurgie sur des coupes de cerveaux de souris des groupes suivants (n = 6-8/groupe):

- souris témoins-opérées
- souris ischémisées
- souris ischémisées traitées par le rt-PA (0,9 mg/kg)
- souris ischémisées traitées par le rt-PA (10 mg/kg)

La surface du marquage obtenu par immunofluorescence a été évaluée dans les régions du cœur et de la bordure ; elle est exprimée en μm^2 .

➤ Mise au point

Au cours d'une étude préliminaire réalisée sur quelques échantillons, nous avons déterminé la dilution de l'AC primaire (1/50^{ème} ou 1/100^{ème}) ainsi que l'utilité d'une étape de blocage (sérum d'âne 5%, 30 minutes).

Nous avons constaté que l'étape de blocage offrait un meilleur rapport signal/bruit de fond et que la dilution de l'AC primaire au 1/100^{ème} était suffisante pour mettre en évidence un marquage vasculaire correspondant à ICAM-1 (figure 49).

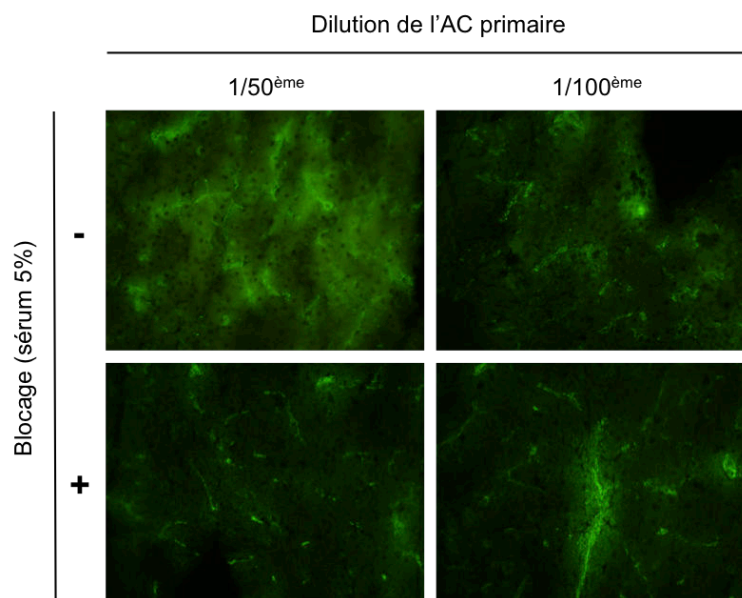


Figure 49 : Mise au point du marquage d'ICAM-1 par immunofluorescence

Après avoir établi les conditions optimales pour mettre en évidence ICAM-1 par immunofluorescence, nous avons ensuite réalisé ce marquage sur l'ensemble des échantillons.

➤ Résultats

Vingt-quatre heures après la chirurgie, les souris témoins-opérées présentent un très faible marquage au niveau cortical comme l'illustre la figure 50. En revanche, un marquage vasculaire est nettement visible dans le cortex de l'hémisphère ischemié des souris traitées ou non par le rt-PA aux doses de 0,9 ou 10 mg/kg.

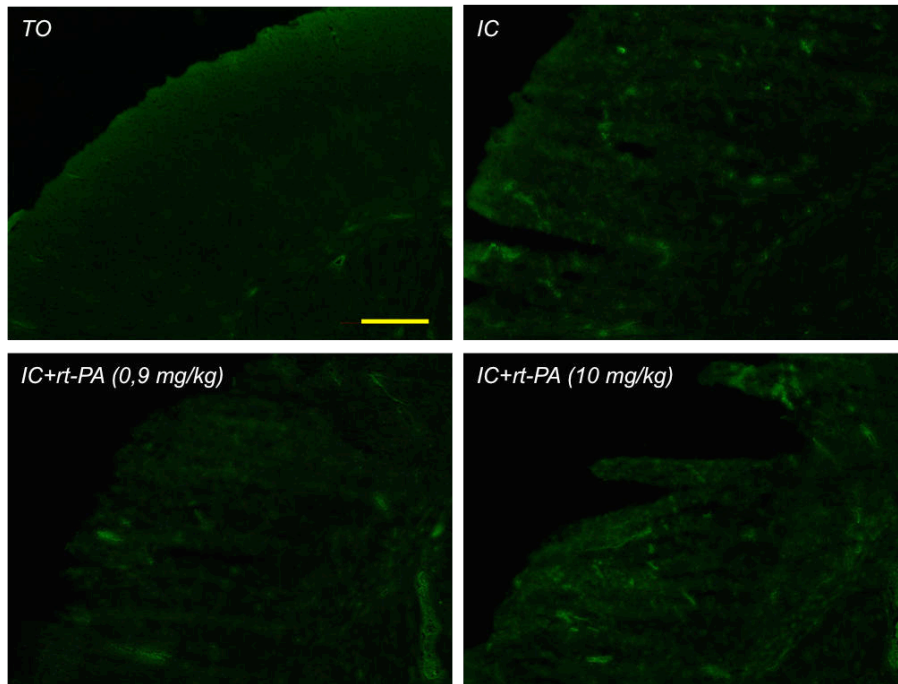


Figure 50 : Photos représentatives de l'expression d'ICAM-1 à 24 heures au niveau du cortex ipsilatéral

TO : souris témoins-opérées, IC : souris ischemiées. La barre d'échelle représente 400 μm .

La quantification du marquage dans le cortex ipsilatéral (*i.e.* dans le cœur et en bordure de la lésion) a permis de mettre en évidence une augmentation significative (+157%) de l'expression d'ICAM-1 24 heures après l'ischémie cérébrale (souris ischemiées : $20\,9409 \pm 40\,204 \mu\text{m}^2$ versus souris témoins-opérées : $81\,389 \pm 30\,457 \mu\text{m}^2$; $P < 0,01$; figure 51.A). Nos résultats montrent une augmentation de l'expression d'ICAM-1 entre les niveaux 4 et 10 (figure 51.B). Le traitement par le rt-PA à la faible dose (0,9 mg/kg) ou à la forte dose (10 mg/kg) ne modifie pas l'expression post-ischemique d'ICAM-1 (figure 51.A); notons toutefois une exception pour le niveau 12 où la forte dose de rt-PA (10 mg/kg) entraîne une augmentation significative d'ICAM-1 par rapport aux souris ischemiées ($P < 0,05$; figure 51.B).

Lorsque l'on distingue la région du cœur (figure 51.C) de la bordure de la zone infarctée (figure 51.D), on retrouve (1) une augmentation significative d'ICAM-1 après l'ischémie ($P < 0,01$ pour les deux régions), et (2) le rt-PA est sans effet et ce, quelle que soit sa dose.

En comparant pour chaque groupe d'animaux la région cœur par rapport à la région bordure, nos résultats montrent que les souris ischémisées traitées par la forte dose de rt-PA (10mg/kg) ou par le solvant, expriment significativement plus la protéine ICAM-1 dans la région du cœur de la lésion qu'en bordure ($P < 0,05$ pour les deux comparaisons ; test de Wilcoxon). Chez les animaux traités par la dose de 0,9 mg/kg de rt-PA, ICAM-1 tend également à être majoritairement exprimée dans le cœur ($P = 0,055$; test de Wilcoxon).

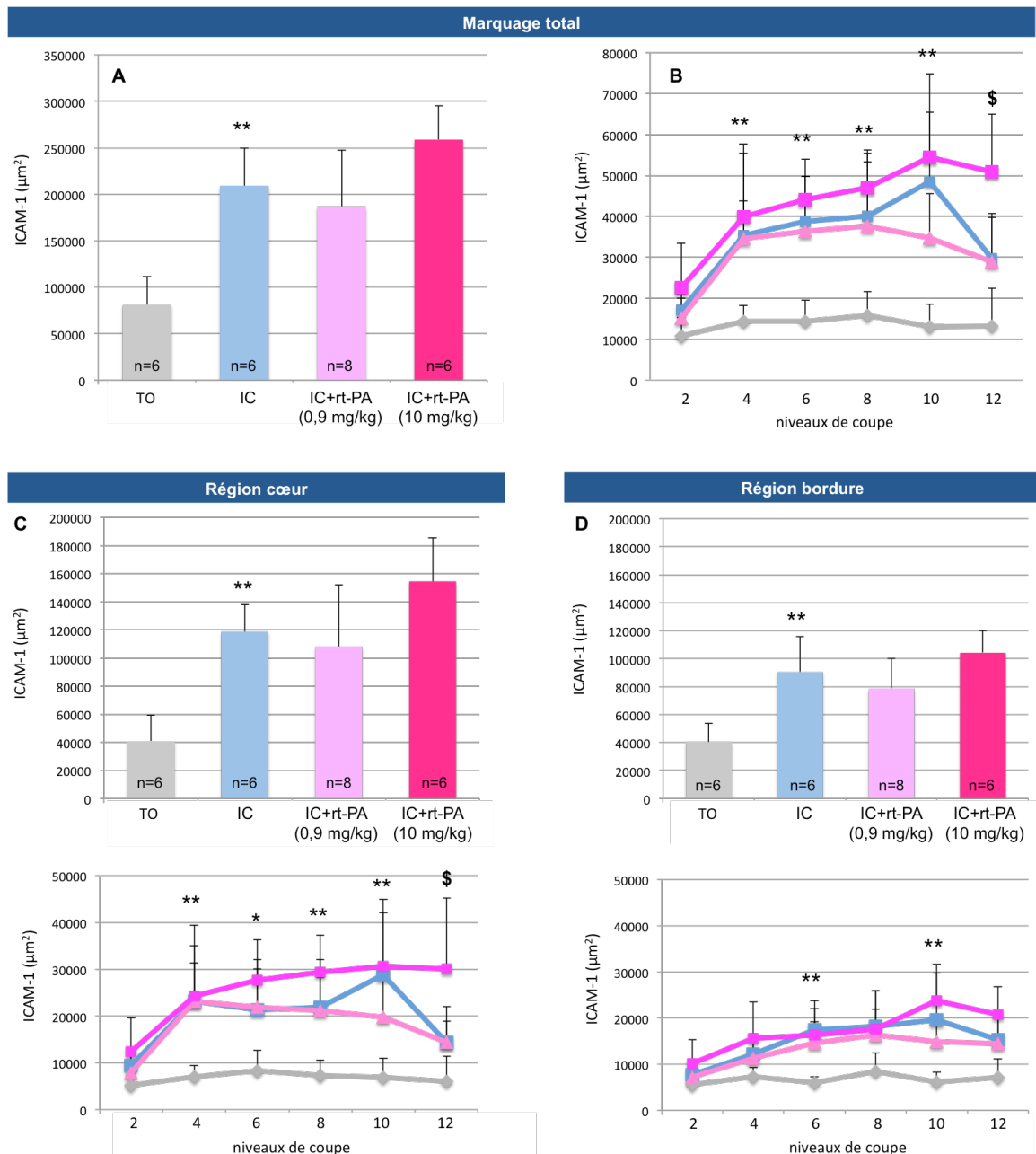


Figure 51 : Évaluation de l'expression d'ICAM-1 par IHC à 24 heures : effet de l'ischémie et du traitement par le rt-PA

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sd. * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ souris ischémisées versus souris témoins-opérées ; \$: $P < 0,05$ souris ischémisées traitées par le rt-PA (10 mg/kg) versus souris ischémisées traitées par le solvant. TO : souris témoins-opérées, IC : souris ischémisées.

c) Discussion

Ces travaux viennent compléter l'étude des effets délétères de l'ischémie cérébrale et du rt-PA au niveau de l'endothélium. Après VCAM-1, nous nous sommes intéressés à un second marqueur d'atteinte endothéliale et d'inflammation : ICAM-1.

Dans un premier temps, nous avons recherché l'effet de l'ischémie et du rt-PA (0,9 mg/kg) sur l'expression d'ICAM-1 à un temps précoce (6 heures) et plus tardif (24 heures) par Western blot. Tout comme pour VCAM-1, cette technique n'a pas permis de mettre en évidence de modification de l'expression d'ICAM-1 que ce soit par l'ischémie ou par le rt-PA, à 6 heures ou à 24 heures. Notons que la littérature rapporte peu d'études ayant examiné l'expression post-ischémique d'ICAM-1 par Western blot ; citons néanmoins celles de Chen et al. (2009) et Luo et al. (2006) qui ont mis en évidence une augmentation d'ICAM-1 à 24 heures dans des modèles d'ischémie mécanique transitoire. La majorité des études a recherché l'expression de la protéine ICAM-1 par IHC, ou a quantifié l'expression de son ARNm.

Nous avons donc poursuivi ces travaux par une étude par IHC à 24 heures. Nous nous sommes intéressés aux effets du rt-PA administré non seulement à la dose de 0,9 mg/kg, mais également à la dose de 10 mg/kg.

L'étude par IHC nous a permis de constater que **l'expression d'ICAM-1 est augmentée 24 heures après l'ischémie cérébrale** au niveau du cortex, à la fois dans le cœur de la lésion mais également en bordure. L'augmentation post-ischémique de l'expression d'ICAM-1 a également été montrée dans d'autres modèles d'ischémie transitoire et permanente, tant au niveau de la protéine par IHC (Zhang et al., 1995; Okada et al., 1994b), que de son ARNm (Zhou et al., 2013; Haddad et al., 2006; Vemuganti et al., 2004; Wang et Feuerstein, 1995; Wang et al., 1994). L'ensemble de ces résultats est à rapprocher de ce qu'il se passe en clinique puisqu'il a été rapporté une augmentation significative de l'expression de la forme soluble d'ICAM-1 dans les heures qui suivent un AVCi (Ehrensperger et al., 2005; Selaković et al., 2003; Bitsch et al., 1998).

Concernant l'effet du rt-PA, nos résultats montrent que ni la dose de 0,9 mg/kg, ni celle de 10 mg/kg ne modifient l'expression d'ICAM-1 après 24 heures d'ischémie.

Comme nous l'avons vu précédemment pour VCAM-1, à l'heure actuelle très peu d'études ont recherché l'effet du rt-PA sur l'expression des molécules d'adhésion. Citons néanmoins celle de R. L. Zhang et al. (1999) réalisée dans un modèle d'ischémie cérébrale par injection de caillot homologue chez le rat. Cette étude a montré qu'une administration tardive de rt-PA (10 mg/kg)

augmente l'expression d'ICAM-1 après 24 heures d'ischémie, à la fois dans l'hémisphère ipsilatéral et controlatéral. Les travaux de Miyazaki et al. (2011) ont ensuite confirmé ce résultat puisqu'ils ont rapporté que le rt-PA (10 mg/kg) entraîne une augmentation des taux d'ARNm d'ICAM-1 24 heures après une ischémie induite par photothrombose chez la souris. Ces deux études ne sont donc pas en accord avec nos résultats. Néanmoins, nos travaux sont à rapprocher de ceux de Lenglet et al. (2014a) qui montrent qu'une administration de rt-PA (10 mg/kg) ne modifie pas les taux d'ARNm d'ICAM-1 dans les 3 jours qui suivent une ischémie cérébrale transitoire (occlusion par un filament).

Par la suite, la dernière étape de cette étude consistera à évaluer par IHC, l'effet du PJ34 (3 mg/kg, 1 ou 2 injections) sur l'expression d'ICAM-1 à 24 heures, chez des souris ischémisées traitées ou non par le rt-PA (0,9 mg/kg). Ce travail nous permettra de préciser le rôle de la PARP dans l'expression post-ischémique d'ICAM-1 dans notre modèle.

Le rôle délétère d'ICAM-1 à la suite de l'ischémie cérébrale a été démontré expérimentalement par plusieurs études. En effet, l'inhibition génique d'ICAM-1 (souris ICAM-1^{-/-}) ou de son ARNm (oligonucléotides antisens) ou de la protéine (AC anti-ICAM-1) est à l'origine d'un effet neuroprotecteur *via* une diminution du volume de lésion et du déficit neurologique post-ischémique (Vemuganti et al., 2004; Chopp et al., 1996; Connolly et al., 1996a; Bowes et al., 1993). Connolly et collaborateurs (1996a) ont en particulier mis en évidence que la neuroprotection observée chez des souris ICAM-1^{-/-} à la suite d'une ischémie mécanique transitoire, est associée à une diminution de l'accumulation des neutrophiles (PMN) qui contribuent au développement de la lésion post-ischémique. D'autre part, cette même équipe a montré que 24 heures après l'ischémie, les souris ICAM-1^{-/-} présentent une meilleure reperfusion cérébrale, évaluée par la mesure du DSC, par rapport aux souris ICAM-1^{+/+}. Ces travaux soulignent le rôle d'ICAM-1 dans les phénomènes de « no-reflow » post-ischémiques. Par conséquent, il sera d'autant plus intéressant d'examiner si le PJ34 diminue l'expression d'ICAM-1. Si tel est le cas, cet effet pourrait donc contribuer non seulement au rôle neuroprotecteur du PJ34, mais également à l'amélioration de la reperfusion cérébrale induite par le rt-PA, deux effets du PJ34 qui ont été mis en évidence dans notre modèle.

3. Détection des microparticules (MPs)

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Boulanger (INSERM-U970, Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire, HEGP). La détection des MPs à partir d'échantillons prélevés *in vivo* (sang et tissu cérébral) a demandé un grand nombre d'essais que j'ai réalisés avec l'aide du Dr Vion. Le but était d'élaborer le protocole de marquage de CD144 (VE-cadhérine), CD31 (PECAM-1), CD41 (GPIIb) et de la phosphatidylsérine pour ces échantillons. Les différentes expériences réalisées sont brièvement détaillées ci-dessous.

a) Recherche des MPs circulantes

Les premiers essais de marquage (notamment les marquages à l'Annexine V (AnnV) qui détecte la phosphatidylsérine) ont été réalisés à partir d'échantillons de sang prélevé par ponction intracardiaque. Nous avons alors remarqué d'une part une contamination importante des plasmas de type PFP (platelet free plasma) par les plaquettes, et d'autre part, une quantité très faible d'évènements de type microparticulaire qui, pour être analysable, nécessitaient des volumes d'échantillons plus importants. Ceci nous a donc conduits pour la suite des études, à réaliser les prélèvements sanguins au niveau de la veine cave inférieure. En effet, il s'agit d'un mode de prélèvement qui permet de récupérer un volume important de sang tout en étant peu agressif pour le système vasculaire, et pour lequel le risque d'activer les plaquettes est faible.

Le marquage de CD144 (VE-cadhérine) permet de détecter les MPs d'origine endothéliale. L'AC anti-CD144 est détecté par un AC secondaire fluorescent, ce qui nécessite une étape de blocage par du sérum de rat. Les premiers essais ont été réalisés à partir du PFP de quelques souris naïves et de souris ischémiées traitées par le rt-PA à la forte dose (10 mg/kg) ou par son solvant, et euthanasiées à 24 heures. Après avoir testé deux concentrations de sérum de rat (5 et 10%), nous avons observé qu'un agrégat se formait dans l'échantillon de PFP dès l'étape de blocage en présence de la forte concentration de sérum (10%). L'origine de cet agrégat est inconnue et pourrait résulter d'une accumulation de MPs, ce qui pourrait facilement fausser leur dosage. Aussi, nous avons retenu la quantité de 5% de sérum pour la suite. Par ailleurs, lors de la mise au point du marquage du CD144, nous avons utilisé comme contrôle négatif l'AC isotypique correspondant à l'AC anti-CD144. Le marquage non spécifique des contrôles négatifs étant particulièrement élevé, nous avons réalisé un second essai, cette fois-ci directement sur le culot de MPs préalablement isolé et purifié à partir du PFP. Néanmoins, nous avons de nouveau noté (1) un marquage non spécifique très important qui rend l'analyse particulièrement difficile, (2) une quantité très faible d'évènements de type microparticulaire et (3) une grande variabilité entre les échantillons.

Au vu de ces résultats, nous avons souhaité utiliser un autre marquage: le marquage CD31-CD41.

La détection de **CD31 (PECAM-1)** signe l'origine endothéliale ou plaquettaire des MPs tandis que le **CD41 (GPIIb)** est propre aux MPs plaquettaires. Ainsi, les MPs d'origine endothéliale sont CD31+/CD41-. La réalisation d'un co-marquage nécessite tout d'abord la mise au point de la détection de chacun des marqueurs.

Les mises au point ont été réalisées en parallèle à partir soit de PFP de souris naïves, soit du culot de MPs issu de ce PFP ; différentes dilutions en AC anti-CD31 et anti-CD41 ont été testées. Néanmoins, nous avons remarqué que l'AC seul ou son isotype seul, dilué dans du PBS en l'absence d'échantillon, entraînait la détection d'un nombre très important d'évènements de type microparticulaire et fluorescents. Ces évènements pourraient donc correspondre à des agrégats d'AC. Afin de diminuer ces agrégats sans pour autant s'opposer au marquage spécifique, nous avons évalué l'intérêt d'une étape préalable de purification des solutions d'AC par centrifugation (13 000g, 4°C, 5 minutes), par sonication ou encore par filtration. Ces mises au point n'ont pu être menées à terme et nécessiteraient donc d'être complétées.

Devant ces difficultés rencontrées pour la détection des MPs d'origine endothéliale, nous avons par la suite cherché à détecter toutes les MPs circulantes, quelle que soit leur origine cellulaire, et ceci par le marquage par **l'AnnV de la phosphatidylsérine** présente sur le feuillet externe des MPs. Des essais ont été réalisés à partir de PFP de souris naïves. Ont également été analysés des échantillons de PFP de souris naïves appartenant à une autre souche que les souris Swiss utilisées jusqu'à présent. Il s'agit de souris C57BL/6 pour lesquelles le protocole de marquage à l'AnnV avait été élaboré et validé par l'équipe du Dr Boulanger.

Le marquage obtenu n'a pas permis de distinguer parfaitement la population de MPs_AnnV+ parmi le marquage non spécifique et demanderait donc encore à être amélioré. Néanmoins, les résultats préliminaires sembleraient montrer que (1), de manière surprenante, les souris Swiss naïves possèdent un faible nombre de MPs_AnnV+ par rapport aux souris naïves C57BL/6 et (2) ce taux paraît extrêmement variable d'une souris à l'autre. Par conséquent, les souris Swiss pourraient ne pas représenter un modèle adapté pour l'étude des MPs circulantes. Il serait donc préférable de se tourner vers une souche de souris telles que les C57BL/6 pour lesquelles les taux de MPs circulantes semblent plus importants et moins variables. L'analyse de la littérature montre d'ailleurs que la majorité des dosages de MPs circulantes a été réalisée chez les souris C57BL/6, et aucune chez les souris Swiss.

b) Recherche des MPs présentes dans le parenchyme cérébral

Lorsque j'ai débuté ma thèse, aucune étude ne s'était encore intéressée à la détection des MPs présentes au sein du tissu cérébral chez la souris. Nous avons donc élaboré un protocole à partir de celui mis au point et utilisé par l'équipe du Dr Boulanger pour détecter les MPs présentes dans les muscles des membres inférieurs de souris (Leroy et al., 2009). Ce protocole consiste à fractionner le tissu à l'aide d'une paire de ciseaux afin d'obtenir un homogénat. La durée de cisaillement est un paramètre important : elle doit être suffisante afin de permettre l'extraction des MPs, sans être trop longue pour ne pas en générer. Le muscle et le cerveau étant deux tissus de compositions particulièrement différentes, il nous a donc fallu adapter d'une part ce protocole de broyage, et d'autre part le protocole de marquage à l'AnnV. Pour cela, nous avons réalisé une étude préliminaire au cours de laquelle 3 durées de cisaillement ont été testées : 15, 30 et 45 secondes, à partir de cerveaux de souris naïves exsanguinoperfusées afin d'éliminer les MPs présentes dans les vaisseaux cérébraux. Il ne semble pas y avoir d'augmentation du taux de MPs_AnnV+ en fonction de l'augmentation de la durée de cisaillement. Néanmoins, cette étude nécessite d'être complétée avec notamment des échantillons de cerveaux ischémiés afin d'affiner et de standardiser les conditions de broyage. De plus, le marquage requiert d'être également amélioré afin de permettre une distinction plus nette des événements spécifiques et non spécifiques.

c) Discussion : La détection des microparticules *in vivo*

L'augmentation du taux de MPs dans la circulation sanguine a été observée dans quelques modèles animaux de maladies cardiovasculaires telles que le diabète (Chen et al., 2011) ou encore l'ischémie des membres inférieurs (Jeanneteau et al., 2012 ; Shan et al., 2013). Concernant les pathologies cérébrales, une augmentation des taux plasmatiques de MPs a été mise en évidence dans des modèles animaux aussi variés qu'un modèle de la maladie d'Alzheimer chez le rat (Hosseinzadeh et al., 2013), un modèle d'hyperthermie cérébrale (« Heatstroke ») chez le babouin (Bouchama et al., 2008), ou encore un modèle murin de paludisme cérébral (El-Assaad et al., 2014). Toutefois, lorsque nous avons débuté ce travail, il n'existait pas de donnée concernant la détection des MPs dans des modèles animaux d'ischémie cérébrale, alors que plusieurs études cliniques rapportaient une augmentation de la libération de MPs endothéliales et plaquettaires à la suite d'un AVC ischémique (voir Rappels bibliographiques, Chapitre II, paragraphe VI.2). A notre connaissance, ce n'est que récemment que des études précliniques s'intéressant à cette thématique ont été publiées. Les résultats obtenus sont néanmoins discordants :

- Dans un modèle d'hypoperfusion cérébrale chronique réalisé chez le rat, Schock et al. (2014) ont montré une augmentation du taux de MPs circulantes, en particulier d'origine endothéliale, dès 24 heures et qui devient significative à 72 heures ; cette équipe a par ailleurs mis en évidence un

effet délétère de ces MPs puisqu'elles ont entraîné une mort cellulaire par apoptose au contact de cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales.

- En revanche, l'étude de Chen et al. (2011) a montré que 48 heures après l'ischémie cérébrale chez la souris (ischémie permanente par occlusion mécanique), le taux plasmatique des MPE n'est pas augmenté contrairement à celui des MPs issues des progéniteurs endothéliaux circulants.

- D'après les travaux de Shan et al. (2013), l'ischémie cérébrale (modèle transitoire par occlusion mécanique) n'entraîne pas d'augmentation de la libération des MPs à 24 heures, qu'elles soient d'origine endothéliale ou plaquettaire ; cette même étude s'est également intéressée au rôle des MPs plaquettaires produites chez des rats après de courtes périodes répétées d'ischémie/reperfusion (préconditionnement ischémique) du membre inférieur et qui ont été réinjectées chez des animaux ayant subi une ischémie cérébrale : ces MPs ont induit un effet protecteur puisqu'elles ont permis de diminuer significativement la lésion cérébrale.

- De même, Hayon et al. (2012) ont démontré le rôle bénéfique de MPs plaquettaires administrées à la suite de l'ischémie cérébrale permanente chez le rat, *via* une augmentation de la prolifération cellulaire, de la neurogenèse et de l'angiogenèse.

Par conséquent, l'étude de la libération des MPs à la suite d'une ischémie cérébrale ainsi que l'évaluation de leur rôle délétère ou au contraire bénéfique, représentent actuellement un axe de recherche qui mériterait d'être plus largement investigué en préclinique.

Parallèlement au projet *in vivo*, j'ai réalisé des travaux *in vitro* afin de compléter l'étude des atteintes endothéliales induites par le rt-PA et d'en préciser les mécanismes et les voies de signalisation.

DEUXIÈME PARTIE

Études *in vitro* des effets du rt-PA sur les cellules endothéliales

Les techniques *in vitro* de culture cellulaire ont été introduites en 2012 au laboratoire par le Dr Leconte, afin de rechercher dans un modèle « plus simple » les mécanismes impliqués dans les phénomènes observés *in vivo* dans nos modèles d'ischémie cérébrale. En particulier, nous avons développé des cultures de cellules endothéliales, afin de déterminer si la toxicité vasculaire du rt-PA au cours de l'ischémie (caractérisée notamment par l'aggravation des transformations hémorragiques) était liée à un effet direct de celui-ci sur l'endothélium. Pour ces études, nous avons choisi de travailler sur des **cultures de cellules endothéliales cérébrales murines immortalisées** appartenant à la **lignée bEnd.3** (ATCC CRL®-2299™). Outre le fait que ces cellules sont facilement cultivables, elles ont pour avantage de posséder différentes caractéristiques de la BHE. En effet, les cellules bEnd.3 présentent une faible perméabilité associée à l'expression de protéines des jonctions serrées (occludine, claudine-1 et -5, zonula occludens-1 et -2) et des jonctions adhérentes (VE-cadhérine) ; elles expriment également des transporteurs de la BHE tels que la P-glycoprotéine, Glut-1, MCT-1 et -2, OAT1 et MRP (Watanabe et al., 2013; Brown et al., 2007; Omid et al., 2003). Par ailleurs, il a été montré que les propriétés de barrière des cellules bEnd.3 sont bien supérieures à celles de deux autres lignées, bEnd.5 et MBEC4 (mouse brain endothelial cell 4), et sont semblables à celles des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales (Watanabe et al., 2013; Brown et al., 2007). De plus, à la différence des cultures primaires, les cellules bEnd.3 conservent leurs propriétés de barrière au fil des passages (Brown et al., 2007). Il est également important de noter que des études récentes ont démontré que les cellules bEnd.3 sont sensibles au rt-PA. En effet, l'incubation de ces cellules en présence de rt-PA est à l'origine d'une augmentation (1) de la perméabilité cellulaire (Won et al., 2014), (2) des taux de MMP-3 (Suzuki et al., 2009), (3) de la sécrétion de VEGF (Won et al., 2014), (4) de l'expression d'ICAM-1 (J. Wang et al., 2014). La lignée de cellules bEnd.3 a donc été considérée comme appropriée pour la réalisation de nos études *in vitro*.

Lorsque j'ai débuté mes travaux, seule une étude préliminaire menée par le Dr Leconte et le Dr Teng (alors doctorante au laboratoire) avait montré un effet du rt-PA, à la concentration de 20 µg/ml, sur la morphologie des cellules bEnd.3. Cette concentration de rt-PA correspondait à celle fréquemment retrouvée dans les études *in vitro*, et notamment sur les cellules bEnd.3 (J. Wang et al., 2014; Won et al., 2014; Suzuki et al., 2009). Nous avons décidé d'approfondir l'étude de l'effet du rt-PA avec une gamme de concentration comprenant non seulement la concentration de 20 µg/ml, mais aussi celle de 40 µg/ml qui est retrouvée dans le sang 30 minutes après une administration intraveineuse de

rt-PA (10 mg/kg) chez le rat (Godfrey et al., 1998), et enfin une dernière concentration plus forte de 80 µg/ml.

La première partie de nos travaux a consisté à étudier l'effet de cette gamme de concentrations de rt-PA sur la morphologie et l'organisation des cellules bEnd.3 à l'aide d'un microscope inversé. Nous avons ensuite complété ces travaux par l'étude de l'effet du rt-PA sur l'expression de molécules de jonctions endothéliales. Enfin, nous avons recherché un effet pro-inflammatoire du rt-PA en étudiant les deux marqueurs précédemment retrouvés dans nos études *in vivo*, ICAM-1 et VCAM-1.

Dans un second temps, nous avons émis l'hypothèse que le rt-PA pourrait engendrer des atteintes endothéliales *via* la production de microparticules endothéliales, ces MPE n'étant plus aujourd'hui considérées uniquement comme des marqueurs d'atteintes endothéliales mais aussi comme des acteurs importants dans ces atteintes. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Boulanger et le Dr Vion (INSERM-U970, Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire, HEGP). Une partie des résultats de ces travaux est présentée sous la forme de l'article qui a été soumis à *Thrombosis Research*.

I. Effet du rt-PA sur la morphologie et l'organisation des cellules bEnd.3

➤ Protocole expérimental

Les cellules bEnd.3 ont été traitées par le rt-PA à la concentration de 20, 40 ou 80 µg/ml dans un milieu de culture dépourvu en SVF ; les cellules contrôles n'ont subi qu'un changement de milieu pour être elles-aussi dans des conditions sans SVF. Après 6 heures d'incubation, la morphologie des cellules a été observée au microscope (n=8/condition).

➤ Résultats

Les cellules contrôles sont uniformément réparties au fond des puits. En revanche, en présence de rt-PA, le tapis cellulaire n'est plus uniforme, les cellules sont disjointes et forment des prolongements entre elles ; leur morphologie est également modifiée puisqu'elles deviennent fusiformes (figure 52). Ces effets apparaissent d'autant plus marqués que la concentration de rt-PA est élevée.

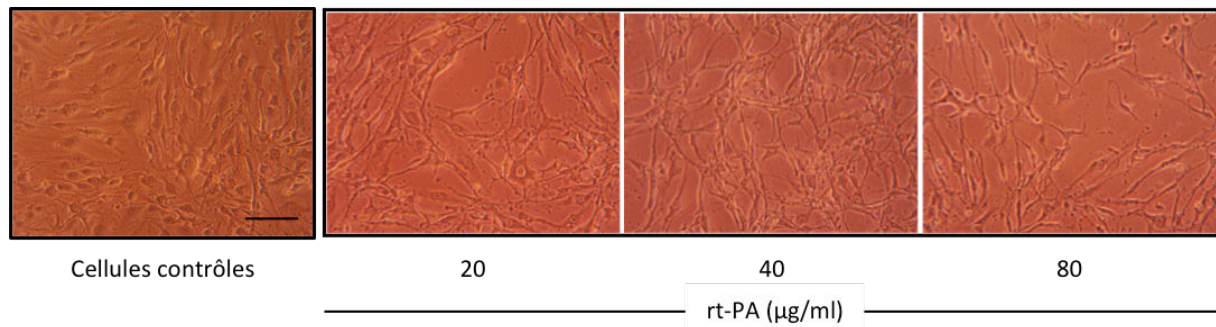


Figure 52 : Photos représentatives de l'effet du rt-PA sur la morphologie des cellules bEnd.3 après 6 heures d'incubation

La barre d'échelle représente 100 μm .

➤ Discussion

La concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ de rt-PA nous a permis de confirmer les modifications de morphologie et d'organisation des cellules bEnd.3 observées lors de l'étude préliminaire des Dr Leconte et Teng. Nous avons montré de plus que ces modifications sont concentration-dépendantes. Cette destructuration du réseau de cellules endothéliales induite par le rt-PA pourrait expliquer, en partie, les transformations hémorragiques induites *in vivo* par ce thrombolytique. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces effets restent cependant à élucider. Nous avons émis l'hypothèse qu'une telle restructuration du tapis cellulaire nécessitait la dégradation des jonctions inter-endothéliales. Nous avons donc cherché à mettre en évidence cette dégradation en étudiant l'effet du rt-PA sur l'expression des protéines de jonction.

II. Effet du rt-PA sur les jonctions inter-endothéliales

Au cours de cette étude, nous avons repris la même gamme de concentrations de rt-PA et nous avons examiné ses effets sur l'expression d'une protéine des jonctions serrées, l'occludine, et d'une protéine des jonctions adhérentes, la VE-cadhérine.

1. Protocole expérimental

Les cellules ont été traitées par le rt-PA à la concentration de 20, 40 ou 80 $\mu\text{g/ml}$ dans un milieu de culture sans SVF ; les cellules contrôles n'ont subi qu'un changement de milieu pour être elles-aussi dans des conditions sans SVF. Après 6 heures (n=8/condition) ou 24 heures (n=6/condition) d'incubation, le lysat cellulaire a été récupéré afin d'étudier l'expression des protéines de jonction (occludine et VE-cadhérine) par Western blot (la valeur de chaque échantillon est rapportée à celle obtenue pour l'actine et exprimée en unités arbitraires).

2. Résultats

➤ Occludine

L'occludine est une protéine de 65 kDa. Le Western blot obtenu montre chez les cellules contrôles une seule bande qui, d'après le marqueur de masse moléculaire, correspond bien à cette protéine des jonctions serrées (figure 53). Aucune modification de l'expression de l'occludine n'a été mise en évidence après 6 heures ou 24 heures de traitement par le rt-PA et ce, quelle que soit sa concentration (figure 53).

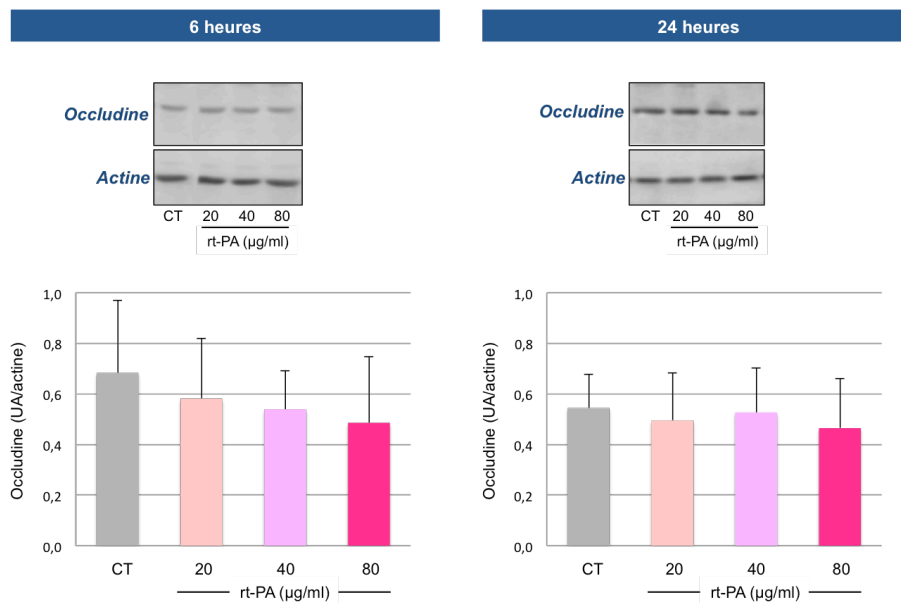


Figure 53 : Effet du rt-PA sur l'expression de l'occludine par les cellules bEnd.3 évaluée par Western blot après 6 heures et 24 heures de traitement

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en unités arbitraires (UA) et corrigés par l'actine. $n = 6-8$ /condition ; CT : cellules contrôles.

➤ VE-cadhérine

Le Western blot de VE-cadhérine a permis de détecter une bande se situant, d'après le marqueur de masse moléculaire, aux environs de 122 kDa, ce qui correspond à la masse moléculaire de cette protéine ; la quantification ne montre aucune différence entre l'expression des cellules contrôles et celles des cellules traitées par le rt-PA (20, 40 ou 80 µg/ml) pendant 6 heures ou 24 heures (figure 54).

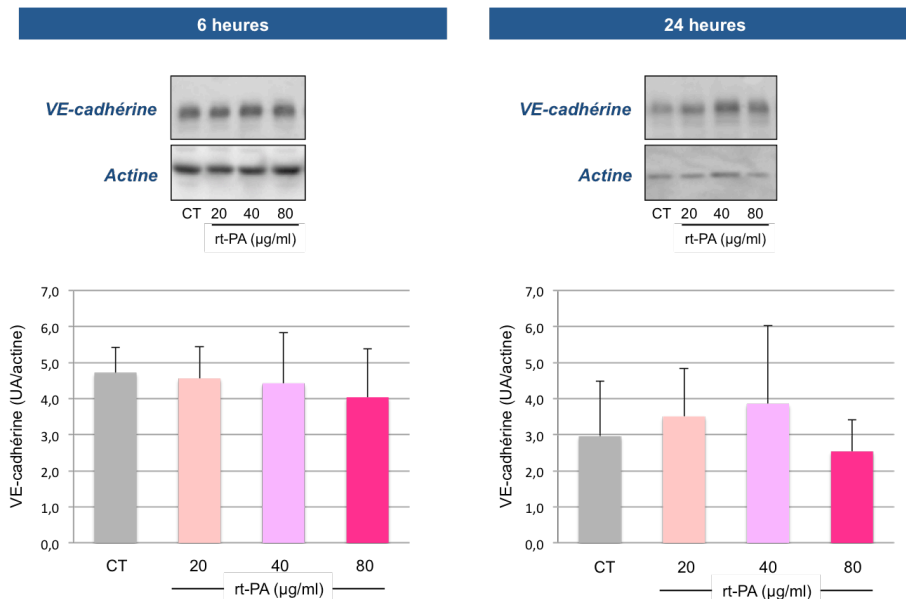


Figure 54 : Effet du rt-PA sur l'expression de la VE-cadhérine par les cellules bEnd.3 évaluée par Western blot après 6 heures et 24 heures de traitement

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en unités arbitraires (UA) et corrigés par l'actine. $n = 6-8$ /condition ; CT : cellules contrôles.

3. Discussion

Au cours de cette première étude, nous avons recherché si la restructuration des cellules bEnd.3 en présence de rt-PA était associée à une atteinte des protéines constituant les jonctions endothéliales serrées et/ou adhérentes. L'effet du rt-PA sur ces protéines ayant déjà fait l'objet au laboratoire d'études *in vivo* dans un modèle permanent d'ischémie cérébrale par occlusion mécanique (Teng et al., 2013), et dans le modèle par injection de thrombine (El Amki et al., en préparation), nous nous sommes donc appuyés sur les résultats de ces expériences.

En ce qui concerne les jonctions serrées, notre choix s'est porté sur l'occludine, le rt-PA entraînant une dégradation significative de cette protéine 24 heures après l'ischémie dans le modèle par injection de thrombine (El Amki et al., en préparation). Notre étude *in vitro* ne met pas en évidence d'effet du rt-PA (quelle que soit sa concentration) sur l'expression de l'occludine par les bEnd.3, et ce, après 6 heures ou même 24 heures d'incubation. Ces résultats négatifs sur l'expression de l'occludine n'excluent cependant pas un effet du rt-PA sur les jonctions serrées. En effet, dans une étude récente également réalisée *in vitro* sur des cellules bEnd.3, Seok et al. (2013) ont montré que l'augmentation de la perméabilité de ces cellules en présence de LPS (lipopolysaccharide) n'était associée ni à une diminution de l'expression de l'occludine, ni à celle de ZO-1, une autre protéine des jonctions serrées, mais à leur relocalisation cytosolique.

Concernant les jonctions adhérentes, nous avons montré au laboratoire que le rt-PA entraîne une diminution importante de l'expression de la VE-cadhérine 24 heures après l'ischémie dans nos deux modèles (Teng et al., 2013; El Amki et al., en préparation). Nos résultats montrent qu'*in vitro*, aucune des 3 concentrations de rt-PA ne modifie l'expression de la VE-cadhérine, après 6 heures ou 24 heures de traitement. Là encore, ces résultats sur l'expression de la VE-cadhérine n'excluent pas un effet du rt-PA sur les jonctions adhérentes. Ainsi, il a été montré que l'augmentation de perméabilité des cellules bEnd.3 induite par l'homocystéine met en jeu la phosphorylation de la VE-cadhérine sans modification de son expression totale (Beard et al., 2012, 2011).

En conclusion, ces résultats qui ne mettent pas en évidence d'effet du rt-PA sur l'expression des deux protéines de jonctions étudiées, devront être complétés par des études immunohistochimiques et de Western blot permettant de révéler des modifications plus fines de localisation et/ou de phosphorylation de ces protéines ; ceci pourrait alors expliquer une altération de leur fonction et *in fine* la restructuration du tapis cellulaire observé dans nos conditions avec le rt-PA.

D'autre part, nous ne pouvons exclure que la dégradation des protéines de jonctions observée *in vivo* dans nos modèles d'ischémie cérébrale soit liée à un effet indirect du rt-PA, celui-ci pouvant franchir la BHE et agir sur d'autres cellules de l'unité neuroglivovasculaire qui seraient elles responsables de la dégradation des protéines de jonctions endothéliales. Ainsi dans notre système *in vitro* de monoculture endothéliale, ces effets du rt-PA ne pourraient être reproduits.

III. rt-PA et activation des cellules bEnd.3 : recherche d'un effet pro-inflammatoire

Au cours de cette étude, nous avons recherché si la restructuration des cellules bEnd.3 à la suite de leur incubation avec le rt-PA était associée à leur activation et notamment à un effet inflammatoire de ce traitement. Pour cela, nous avons examiné l'effet du rt-PA sur deux marqueurs de l'inflammation précédemment étudiés *in vivo* dans notre modèle d'ischémie cérébrale, ICAM-1 et VCAM-1.

1. Protocole expérimental

Les cellules ont été traitées par le rt-PA à la concentration de 20, 40 ou 80 µg/ml dans un milieu de culture sans SVF ; les cellules contrôles n'ont subi qu'un changement de milieu pour être elles-aussi dans des conditions sans SVF. Après 6 heures (n=8/condition) ou 24 heures (n=6/condition) d'incubation, le lysat cellulaire a été récupéré afin d'étudier l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 par

Western blot (la valeur de chaque échantillon est rapportée à celle obtenue pour l'actine et exprimée en unités arbitraires).

2. Résultats

➤ ICAM-1

Une seule bande autour de la masse moléculaire d'ICAM-1 (*i.e.* 100 kDa) a été mise en évidence lors du Western blot de cette protéine. Après quantification, l'expression d'ICAM-1 par les cellules traitées pendant 6 heures ou 24 heures par le rt-PA (20, 40 ou 80 µg/ml) n'est pas augmentée par rapport à celle des cellules contrôles (figure 55).

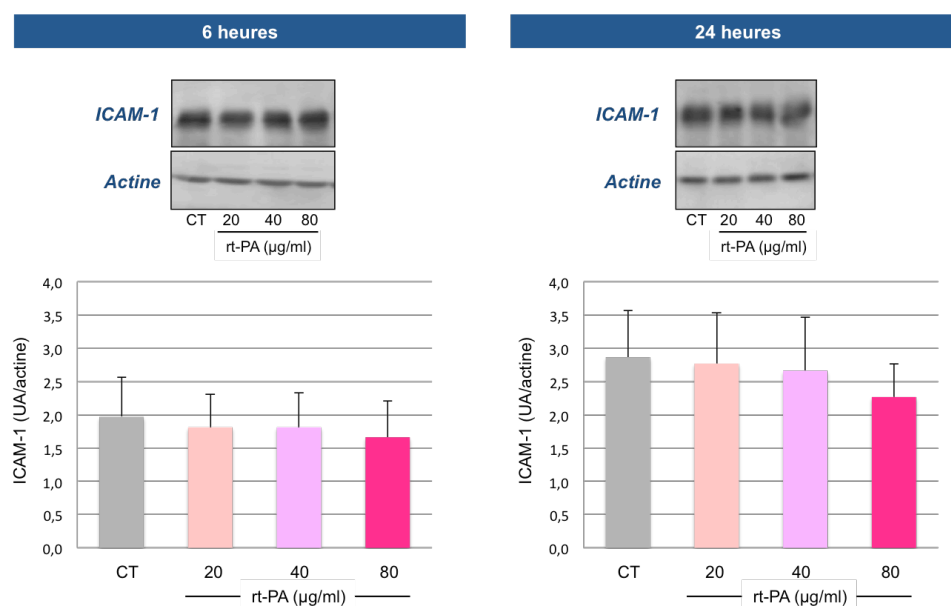


Figure 55 : Effet du rt-PA sur l'expression d'ICAM-1 par les cellules bEnd.3 évaluée par Western blot après 6 heures et 24 heures de traitement

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en unités arbitraires (UA) et corrigés par l'actine. $n = 6-8$ /condition ; CT : cellules contrôles.

➤ VCAM-1

Le Western blot de VCAM-1 a permis de détecter une bande vers 100 kDa, ce qui correspond bien à la masse moléculaire de cette protéine. La quantification ne montre aucune différence entre les cellules contrôles et les cellules traitées pendant 6 heures par le rt-PA (20, 40 ou 80 µg/ml) (figure 56).

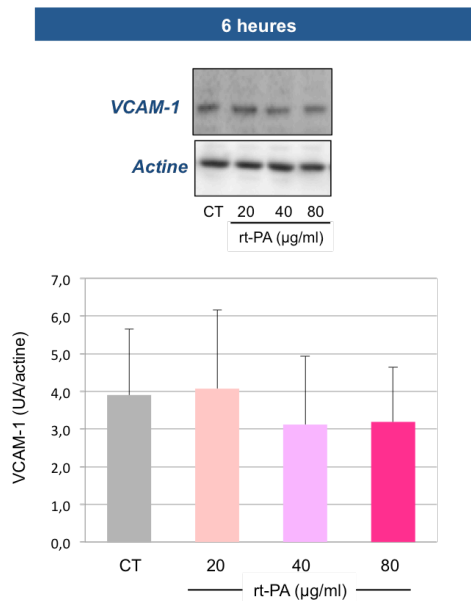


Figure 56 : Effet du rt-PA sur l'expression de VCAM-1 par les cellules bEnd.3 évaluée par Western blot après 6 heures de traitement

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en unités arbitraires (UA) et corrigés par l'actine. $n=8$ /condition ; CT : cellules contrôles.

3. Discussion

Nos résultats montrent que le rt-PA ne modifie ni l'expression d'ICAM-1, ni celle de VCAM-1, et ce même en augmentant la concentration du rt-PA jusqu'à 80 µg/ml. Ces résultats *in vitro* sont à rapprocher de ceux obtenus lors de nos précédents travaux *in vivo*, au cours desquels nous avons montré que dans le modèle d'ischémie cérébrale par injection de thrombine, le rt-PA ne modifie pas l'expression de ces deux molécules d'adhésion.

Toutefois, ces résultats vont à l'encontre de ceux de J. Wang et al. (2014). En effet, après avoir traité les cellules bEnd.3 par différentes concentrations de rt-PA (2,5, 5, 10, 20 µg/ml), cette équipe a mis en évidence une augmentation concentration-dépendante de l'expression d'ICAM-1 avec un effet significatif pour les concentrations de 10 et 20 µg/ml. Notons que dans cette étude, l'effet du rt-PA a été évalué après 48h de traitement ; il serait donc pertinent de compléter nos travaux en examinant l'effet du rt-PA à des temps plus tardifs. Quoi qu'il en soit, ces effets pro-inflammatoires seraient alors postérieurs aux modifications observées à 24 heures.

IV. rt-PA et activation des cellules bEnd.3 : recherche d'une libération de MPE

Lorsque j'ai débuté mes travaux de thèse, aucune donnée n'existait concernant (1) la capacité des cellules bEnd.3 à libérer des MPE et (2) celle du rt-PA à induire cette libération. Deux études préliminaires ont donc été réalisées afin de préciser ces points. Dans la première étude, nous avons recherché si le TNF et la thrombine, deux molécules classiquement décrites dans la littérature comme étant de bons inducteurs de MPE (Lee et al., 2014; Curtis et al., 2009; Simoncini et al., 2009; Sapet et al., 2006; Combes et al., 1999), étaient capables d'entraîner la vésiculation des cellules bEnd.3. Dans la deuxième étude, nous avons recherché un effet du rt-PA sur la production de MPE par ces cellules en reprenant la gamme de concentrations et le temps 6 heures avec lesquels nous avons observé des modifications morphologiques. Les travaux qui ont suivi ces études préliminaires sont présentés sous forme de l'article soumis à *Thrombosis Research*, puis d'études complémentaires.

1. Expériences préliminaires

a) Stimulation des cellules endothéliales par le TNF et la thrombine pendant 24 heures

➤ Protocole expérimental

Les cellules ont été traitées par une gamme de concentrations de TNF (10, 50, 100, 200 ng/ml) ou par 2,5 UI de thrombine /ml dans un milieu de culture dépourvu en SVF. Les cellules contrôles n'ont subi qu'un changement de milieu pour être elles-aussi dans des conditions sans SVF. Après 24 heures d'incubation, la morphologie des cellules a été observée au microscope. Le surnageant de culture a ensuite été récupéré afin d'évaluer le taux de MPE par cytométrie en flux après un marquage par l'Annexine V (AnnV) de la phosphatidylsérine présente sur le feuillet externe des MPs. Le taux de MPE_AnnV+ de chaque échantillon est exprimé en pourcentage par rapport aux cellules contrôles de chaque série (n=4-10/condition).

➤ Résultats

▪ Étude de la morphologie des cellules

Après 24 heures d'incubation, les cellules contrôles sont à confluence et forment un tapis cellulaire homogène au fond des puits. La morphologie des cellules n'est modifiée ni en présence de TNF (même aux fortes concentrations), ni de thrombine (figure 57).

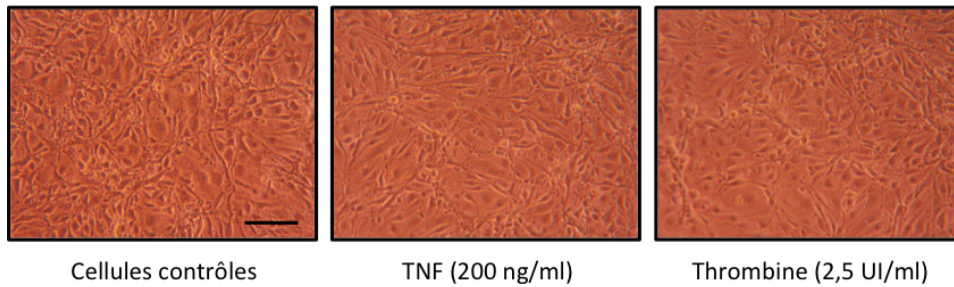


Figure 57 : Photos représentatives de l'effet du TNF et de la thrombine sur la morphologie des cellules bEnd.3 après 24 heures d'incubation

La barre d'échelle représente 100 μ m.

▪ Détection des MPE

Après 24 heures d'incubation, des MPE sont détectées dans le milieu de culture des cellules contrôles. Le TNF n'entraîne pas d'augmentation de la libération de MPE quelle que soit sa concentration (figure 58). La production de MPE n'est pas non plus modifiée par la thrombine.

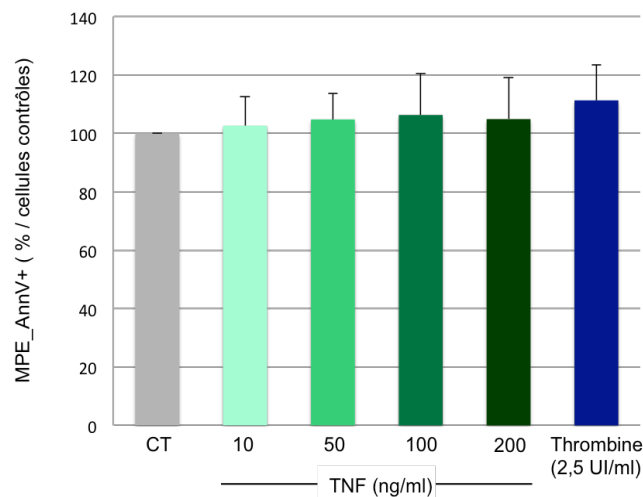


Figure 58 : Effet du TNF et de la thrombine sur la libération des MPE par les cellules bEnd.3 après 24 heures d'incubation

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles. n=4-10/condition ; CT: cellules contrôles.

➤ Discussion

Au cours de cette toute première étude, nous avons tout d'abord observé la présence de MPE dans le surnageant des cellules bEnd.3 contrôles 24 heures après le changement de milieu. Des études ayant rapporté qu'une déplétion du milieu de culture en SVF pouvait stimuler la production de MPE (Mezentsev et al., 2005; Jimenez et al., 2003), nous nous sommes demandés si dans nos conditions expérimentales, l'absence de SVF pendant 24 heures ne serait pas à l'origine des MPE libérées par nos cellules contrôles. Néanmoins, cette hypothèse a ensuite été écartée car nous avons montré au cours d'une seconde étude que le taux de MPE libérées par des cellules incubées 24 heures en

l'absence de SVF n'est pas supérieur à celui des cellules incubées en présence de SVF (résultats non présentés).

L'objectif de cette étude était d'évaluer la capacité des cellules bEnd.3 à produire des MPE grâce à l'utilisation de deux inducteurs connus de la vésiculation, le TNF et la thrombine. Plusieurs études réalisées *in vitro* s'accordent à montrer que le TNF est à l'origine d'une augmentation de la libération de MPE_AnnV+ lorsqu'il est utilisé à des concentrations comprises entre 10 et 100 ng/ml pendant 24 heures (Lee et al., 2014; Curtis et al., 2009; Sapet et al., 2006; Jimenez et al., 2003; Combes et al., 1999). Par conséquent, nous avons choisi d'étudier l'effet d'une gamme de TNF comprise entre 10 et 200 ng/ml sur la libération des MPE par les cellules bEnd.3. De même, il a été montré *in vitro* que des concentrations de thrombine comprises entre 0,1 et 10 UI/ml augmentent la production de MPE (Simoncini et al., 2009; Sapet et al., 2006). Nous avons donc choisi une concentration intermédiaire de 2,5 UI/ml afin d'étudier son effet sur les cellules bEnd.3.

Dans nos conditions, ni le TNF, ni la thrombine n'ont induit de changement au niveau de la morphologie des cellules après 24 heures d'incubation, et ils n'ont pas non plus augmenté la production de MPE. Les cellules bEnd.3 semblent donc présenter une faible sensibilité vis-à-vis du TNF et de la thrombine, à l'inverse des autres types cellulaires utilisés dans les études précédemment citées ; il est à noter que dans ces études, ce sont aussi bien des cultures de cellules primaires (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells ; hAEC, human aortic endothelial cells ; MiVEC, renal/brain microvascular endothelial cells) que des cellules immortalisées (HMEC-1, human microvascular endothelial cells) qui ont été utilisées. Néanmoins, on ne peut exclure qu'il y ait une faible production de MPE induite par nos deux composés, mais que cette production restreinte soit masquée par la libération basale de MPE mise en évidence chez les cellules contrôles.

b) Effet du rt-PA sur la libération des MPE après 6 heures de traitement

➤ Protocole expérimental

Les cellules ont été traitées par le rt-PA à la concentration de 20, 40 ou 80 µg/ml. Après 6 heures d'incubation, le surnageant de culture a été récupéré pour le dosage des MPE par cytométrie en flux. Le taux de MPE_AnnV+ de chaque échantillon est exprimé en pourcentage par rapport aux cellules contrôles de chaque série (n=8/condition).

➤ Résultats

Au cours de cette expérience, les contrôles négatifs (*i.e.* sans ajout de calcium dans le tampon de dosage) des échantillons traités par le rt-PA à la concentration de 80 µg/ml, présentaient un marquage important : entre 13 et 16 % contre 0,07 à 0,1% pour les autres groupes (figure 59.A).

Cette valeur élevée suggérait la présence dans le surnageant des cellules traitées par cette forte concentration de rt-PA, d'un excès de calcium participant à la fixation de l'AnnV et donc au marquage observé. Pour vérifier et contourner ce biais, nous avons décidé d'ajouter de l'EDTA dans le tampon de dosage des contrôles négatifs afin de chélater l'excès de calcium. Pour cela, nous avons testé une gamme de concentrations d'EDTA : 0,33 mM, 1,6 mM, et 3 mM. Comme l'illustre la figure 59.B, la présence d'EDTA permet de réduire le marquage AnnV observé « en absence de calcium » dans les échantillons traités par 80 µg/ml de rt-PA ; les trois concentrations donnant des résultats identiques, nous avons décidé de conserver la concentration d'EDTA intermédiaire de 1,6 mM.

Ainsi, les taux de MPE dans les échantillons contrôles négatifs de cette étude, mais également dans ceux de toutes les études ultérieures, ont été déterminés en présence de 1,6 mM d'EDTA.

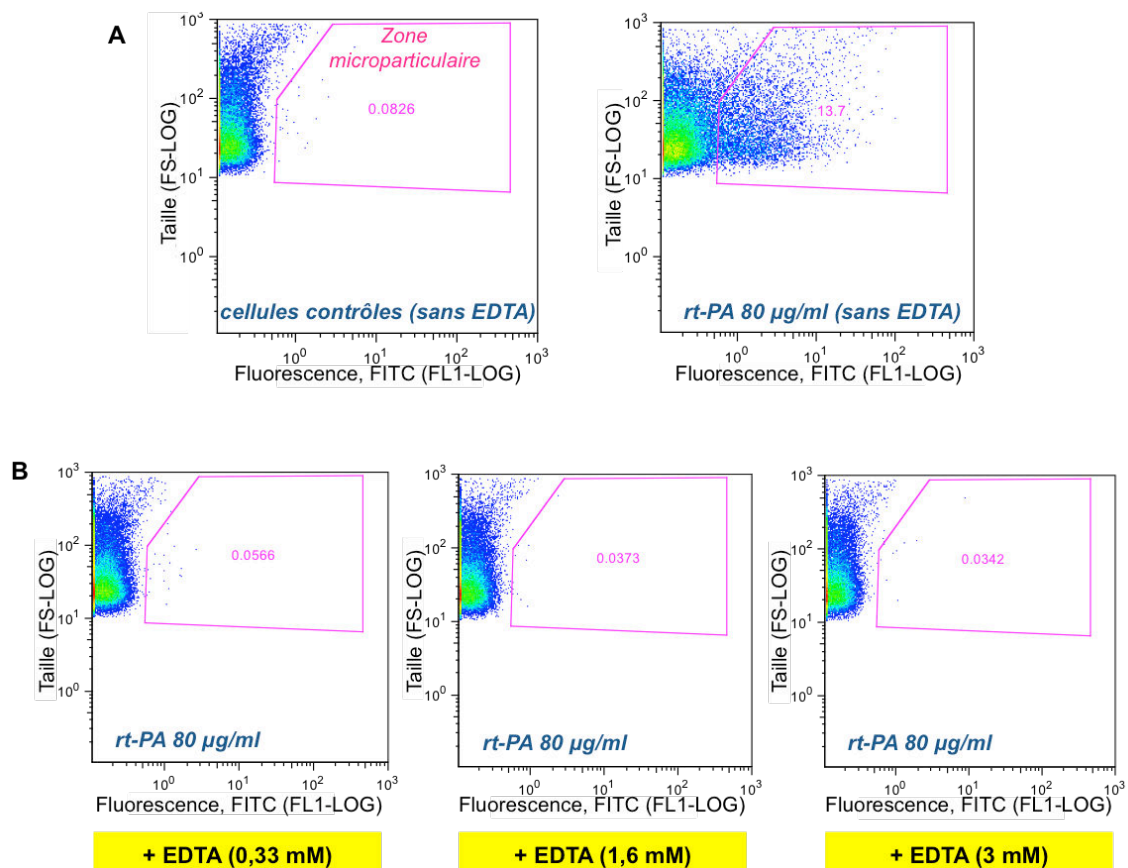


Figure 59 : Effet de l'EDTA sur le marquage des contrôles négatifs

Avec ces nouvelles conditions de dosage, l'incubation des cellules avec la faible concentration de rt-PA (20 µg/ml) ne modifie pas la libération des MPE par rapport aux cellules contrôles (figure 60). Le rt-PA à la concentration de 40 µg/ml tend à doubler le taux de MPE, mais cet effet n'est pas significatif. De même, l'augmentation de 86% de la libération de MPE induite par la forte concentration de rt-PA (80 µg/ml) n'est pas statistiquement significative.

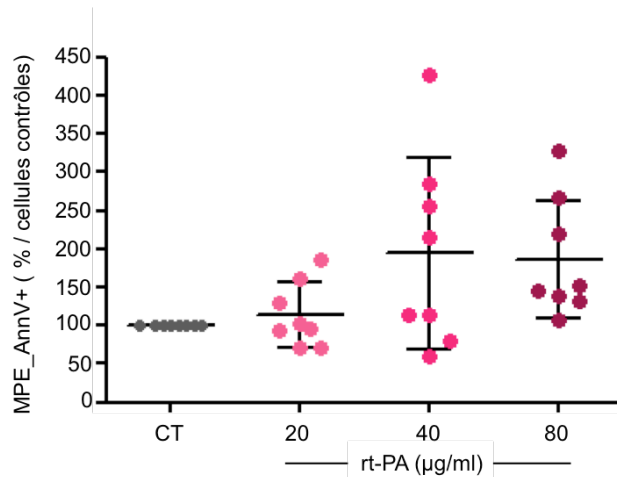


Figure 60 : Effet du rt-PA sur la libération des MPE par les cellules bEnd.3 après 6 heures d'incubation

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles. $n=8$ /condition ; CT : cellules contrôles.

➤ Discussion

Dans les conditions standard de dosage établies par l'équipe du Dr Boulanger, et pour la concentration la plus élevée de rt-PA (80 µg/ml), nous avons observé pour les tubes « contrôles négatifs » un marquage important par l'AnnV, alors que nous n'avions pas ajouté de calcium (nécessaire au marquage) dans ces tubes. L'addition d'EDTA dans le milieu de dosage a permis de ramener les valeurs de ces « contrôles négatifs » proches de celles des cellules contrôles non traitées par le rt-PA, suggérant la présence d'une quantité importante de calcium dans le surnageant des cellules traitées par 80 µg/ml de rt-PA. Il est à noter que ce calcium ne peut provenir que d'un relargage par les cellules elles-mêmes ; les mécanismes à l'origine de ce relargage restent à élucider, mais sont peut-être à rapprocher de l'effet particulièrement marqué du rt-PA à cette concentration sur la morphologie des cellules (voir paragraphe I). Des études visant à évaluer notamment la souffrance cellulaire dans ces conditions seront donc réalisées dans nos études ultérieures.

Concernant les MPE, nous n'avons pas mis en évidence d'effet significatif du rt-PA sur les cellules bEnd.3. Néanmoins, avec les fortes concentrations de rt-PA (40 et 80 µg/ml), nous avons observé une variabilité importante des taux de MPE. Ainsi, pour la concentration de 40 µg/ml par exemple, la moitié des échantillons présente des valeurs voisines de celles des cellules contrôles, tandis que l'autre moitié montre des taux supérieurs à 200%. Face à cette dispersion nous avons émis l'hypothèse que la durée d'incubation de 6 heures était peut-être insuffisante pour induire la production de MPE dans toutes les séries de cultures. Par conséquent, nous avons ensuite examiné les effets de traitements plus prolongés par le rt-PA.

2. Effet du rt-PA sur les cellules bEnd.3 à des temps tardifs

Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis à *Thrombosis Research*.

a) Présentation des objectifs

A la suite des premiers résultats obtenus avec le rt-PA sur la production de microparticules, notre premier objectif a été de déterminer si des temps d'incubation plus longs pouvaient permettre d'observer une augmentation significative des taux de MPE en diminuant la variabilité de nos résultats. Nous avons donc utilisé la même gamme de concentrations de rt-PA que précédemment mais évalué la libération des MPE_AnnV+ par les cellules bEnd.3 après 15 et 24 heures de traitement. Nous avons également examiné la morphologie des cellules, ainsi que leur viabilité par un test MTT.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans la vésiculation induite par le rt-PA. Dans la littérature, les caspases ainsi que les protéines p38 et ROCK sont décrites comme des acteurs clés des voies de signalisation impliquées dans la vésiculation (se référer au paragraphe I.2, Chapitre II, Rappels bibliographiques). Nous avons donc évalué la contribution de ces voies dans la formation des MPE induite par le rt-PA grâce à 3 inhibiteurs spécifiques (respectivement ZVAD-FMK, SB203580 et Y27632). La concentration de chaque inhibiteur a été définie en accord avec celle retrouvée dans la bibliographie (Vion et al., 2013) dans le but d'induire une inhibition optimale sans effet non spécifique.

Par ailleurs, nous avons également recherché si la PARP était impliquée dans la production des microparticules induite par le rt-PA en ayant recours au PJ34. Nous avons dans un premier temps déterminé la concentration optimale de PJ34 à utiliser, concentration à laquelle l'inhibiteur ne doit exercer d'effet propre ni sur la libération de MPE, ni sur la morphologie des cellules ou leur viabilité. Enfin, afin de confirmer l'implication de la PARP dans les mécanismes de vésiculation, nous avons examiné l'effet d'un second inhibiteur de PARP, le INO-1001. Ce travail a fait l'objet d'une expérience complémentaire dont les résultats seront présentés à la suite de l'article.

Tous les inhibiteurs sont appliqués une heure avant le traitement par le rt-PA et pendant toute la durée de l'expérience (*i.e.* 24 heures), afin de maintenir l'inhibition des voies ciblées. A l'issue de l'incubation, les MPE_AnnV+ ont été dosées par cytométrie en flux. La morphologie et la viabilité cellulaires ont également été évaluées.

b) Article

Recombinant tissue-type plasminogen activator enhances microparticles release from mouse brain-derived endothelial cells

Marie GARRAUD^a, Anne-Clémence VION^b, Claire LECONTE^a, Jean-Marie RENARD^b, Catherine MARCHAND-LEROUX^a, Chantal M. BOULANGER^b, Isabelle MARGAILL^a, Virginie BERAY-BERTHAT^a

^a : Equipe de recherche "Pharmacologie de la Circulation Cérébrale" EA4475 Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^b : INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

ABSTRACT

Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) is currently the only approved pharmacological strategy for acute ischemic stroke. However, rt-PA increases the risk of hemorrhagic transformations and may lead to reocclusion. In this context, the purpose of this study was to assess whether rt-PA enhances the production of endothelial microparticles (EMP), which may participate to its vascular toxicity. The molecular effectors involved were also examined. Implication of Rho kinase, caspases and p38-MAPK, known for inducing EMP release, as well as the role of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), that contributes to rt-PA vascular toxicity in experimental stroke, were studied.

The mouse brain-derived endothelial cell line bEnd.3 was used. Cells were treated with rt-PA at 20, 40 or 80 µg/ml during 15 or 24 hours. EMP release in the culture media was quantified by Annexin-V staining coupled to flow cytometry. Cell morphology and viability (MMT assay) were also assessed. The effect of pretreatment (1 hour) with Rho kinase, caspases, p38-MAPK and PARP inhibitors on rt-PA-induced EMP release was also evaluated.

Rt-PA increased EMP release from bEnd.3 cells, the 24 hour-treatment at 40 µg/ml giving the maximal effect (+78% compared to controls). In these conditions, rt-PA also altered cell morphology, without modifying cell viability. The p38-MAPK inhibitor SB203580 (10⁻⁵ M) and the PARP inhibitor PJ34 (100µM) reduced rt-PA-induced EMP production.

This study demonstrates that rt-PA induces the production of EMP by cerebral endothelial cells, through p38-MAPK and PARP pathways.

Keywords

microparticles, recombinant tissue plasminogen activator, endothelial cells, brain, bEnd.3, poly(ADP-ribose)polymerase, p38 MAPK

Abbreviations

Rt-PA, recombinant tissue plasminogen activator; EMP, endothelial microparticles; PARP, poly(ADP-ribose)polymerase; ROCK, Rho-associated protein kinase; PJ34, N-(6-Oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-(N,N-dimethylamino)acetamide hydrochloride; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MMP, matrix metalloproteinases; VEGF, vascular endothelial growth factor; BBB, blood brain barrier; LRP, lipoprotein receptor-related protein; ICAM-1, intercellular cell adhesion molecule; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule

INTRODUCTION

The only pharmacological treatment of acute ischemic stroke is currently recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA), a thrombolytic administered to achieve clot lysis and thus allow reperfusion of the tissue. However, in clinical practice, rt-PA does not induce recanalization in all ischemic patients, and phenomena of arterial reocclusion may occur [1]. Rt-PA also exerts a vascular toxicity leading notably to hemorrhagic transformations [1]. This well-known toxicity towards the neurovascular unit was reported to be related to the direct proteolytic activity of rt-PA and/or, among the most frequently proposed mechanisms, to the activation of matrix metalloproteinases (MMP) [2,3]. We hypothesized that rt-PA could also mediate its vascular toxicity through an increase in the production of endothelial microparticles (EMP).

Microparticles are membrane vesicles produced by cell activation or apoptosis. They are characterized by their size (0.1-1 μm) and by the expression of phosphatidylserine on their outer leaflet [4]. Circulating microparticles, emitted by different cells such as platelets, leukocytes, red blood cells and endothelial cells, are both biomarkers of cell injury and an important emerging class of cell-cell messengers in various pathologies, especially in cardiovascular diseases [4,5]. Experimental and clinical data demonstrated that microparticles contribute to

inflammation, thrombosis, vascular tone and angiogenesis [6]. Although EMP represent a small fraction of the overall pool of plasma microparticles, increased circulating EMP levels constitute an emerging marker of endothelial dysfunction [7,8]. With regard to stroke, clinical studies have shown an increase in circulating microparticles, more particularly particles derived from endothelial cells and platelets [9,10]. Moreover, it has been reported a correlation between circulating EMP of particular phenotypic profiles and the severity and the outcome of acute ischemic stroke [11,12].

The aim of the present study was thus to investigate whether rt-PA could enhance the production of EMP. Using bEnd.3 cells, a mouse brain-derived endothelial cell line, the contribution of the main signaling pathways involved in membrane vesiculation and EMP release, *i.e.* caspases, Rho-associated protein kinase (ROCK) and p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) [7,13,14] were studied. As we previously reported the implication of poly(ADP)ribose polymerase (PARP), an ubiquitous nuclear enzyme, in rt-PA vascular toxicity after experimental cerebral ischemia [15,16], we also examined the effect of PJ34 (N-(6-Oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-(N,N-dimethylamino)acetamide hydrochloride), a potent PARP inhibitor, on rt-PA-induced EMP release.

MATERIALS AND METHODS

Materials

rt-PA (Actilyse®) was purchased from Boehringer-Ingelheim France (Paris, France). The pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (FMK001) was obtained from R&D systems (Lille, France). PJ34 (P4365), the Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor Y27632 (Y0503), the p38-MAPK pathway inhibitor SB203580 (S8307) and the *in vitro* toxicology assay kit MTT based (TOX-1) were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Annexin-V coupled to fluorescein isothiocyanate (AnnV-FITC; IM3546) was obtained from Beckman Coulter (Villepinte, France). Unless specified, biochemical reagents were obtained from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

Cell culture and evaluation of morphologic changes

Transformed mouse brain endothelial cells bEnd.3 (ATCC® CRL-2299™, Manassas, Virginia, USA) purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. Cell line passages of < 30 were used for all experiments.

bEnd.3 cells were cultured in 96 well plates (4x10⁴ cells/well) to assess cell viability, and in 24 well plates (2x10⁵ cells/well) for the evaluation of EMP release and morphologic changes.

Cell morphology was observed with a phase-inverted microscope (VWR, Fontenay sous Bois, France), and images were taken (Moticam camera 580 5.0 MP, Motic, Barcelona, Spain).

EMP isolation and detection by flow cytometry

EMP were isolated according to Vion et al. [17]. Media were collected and cell debris were eliminated by centrifugation (600 g; 15 min; 4°C). The resulting supernatant was then ultracentrifuged (20 500 g; 90 min; 4°C) to pellet EMP, which were resuspended in 150 µl of 0.1 µm-filtered phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4) and stored at -80°C until analysis.

Twenty microliters of EMP resuspended pellet were incubated with 100 µl of annexin-V coupled to fluorescein isothiocyanate (AnnV-FITC) in AnnV binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.4) 30 min at 4°C in the dark. As calcium is required for AnnV binding, control experiments were performed in calcium free buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1,6 mM EDTA, pH 7.4). All buffers were filtered through a 0.1 µm filter. Stained samples were well mixed and analyzed using a highly sensitive flow cytometer (Gallios, Beckman Coulter, Brea,

CA, USA). Flow-count fluorospheres (Spherotech, Illinois, USA) were used to establish EMP concentration in the sample. Events less than 1 μm diameter were identified in forward scatter and side scatter intensity dot representation, in comparison with fluorescent microbeads (0.3, 0.5 and 0.9 μm in diameter; Megamix Biocytex, Marseille, France). EMP were defined as elements with a size less than 1 μm and greater than 0.1 μm that were positively labeled by AnnV in a calcium-dependent manner. Data were analyzed using Flow-Jo software (version 10.0.7; TreeStar, Ashland, OR).

Determination of the cell viability

The MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay, that measures the cell viability by the determination of the mitochondrial activity in living cells, was performed according to the manufacturer's instructions on cells in 96 well plates. Briefly, 15 hours or 24 hours after treatment, 10 μl of MTT was added to each well. After a 3 hour-incubation at 37°C, 80 μl of solubilization solution was added to each well. The reduction of MTT to formazan by mitochondrial dehydrogenases within viable cells was measured using a microplate reader (SPECTRO star^{Nano}, BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France) at a wavelength of 570 nm and a correction of interference at 690 nm.

Cell treatment

After 24 hours of culture, confluent cells were incubated with treatments in a serum free-medium.

In a first study, cells were treated with a range of rt-PA concentrations (20, 40 or 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 15 hours or 24 hours. In order to study p38-MAPK, caspases and ROCK implication involved in rt-PA-induced EMP release, SB203580 (10^{-5} M), Y27632 (10^{-6} M), Z-VAD-FMK ($2 \cdot 10^{-5}$ M) were respectively added 1 hour prior to rt-PA (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treatment and in combination with rt-PA (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hours. Concentrations of inhibitors were chosen according to Vion et al. [17]. Stock solutions of SB203580 and Z-VAD-FMK were obtained in pure DMSO and then further diluted in medium. It has been reported that DMSO 0.1%, corresponding to the concentration present in medium + inhibitor solution, did not affect basal release of EMP on human umbilical vein endothelial cells [17]. PJ34, a PARP inhibitor, was tested to evaluate the role of PARP-1 in the rt-PA-induced EMP production. First, the effect of a range of PJ34 concentrations (10, 25, 50 or 100 μM) was studied after a 24-hour incubation. Then, PJ34 at 10 or 100 μM was added 1 hour prior to rt-PA (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treatment and in combination with rt-PA (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hours.

The experiments were carried out in several series. EMP levels and viability are expressed as a percentage relative to control cells of each serie of experiments.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SD. Statistical analysis were performed with one-way ANOVA followed by Dunnett's test for comparisons between control and treatments conditions, or by Bonferroni corrected test for multiple comparisons. All statistical testing were conducted using Statview 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). P-values $<$ 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

1) Effects of rt-PA on bEnd.3 cells

rt-PA induces EMP release after 15 hours and 24 hours of treatment

After a 15-hour incubation, EMP levels in the

supernatant of bEnd.3 cells treated with rt-PA at 20 μ g/ml were not different from those of control cells (figure 1A). However, at 40 μ g/ml and 80 μ g/ml, rt-PA significantly increased EMP release compared to controls by 55% ($P<0.01$) and 47% ($P<0.05$) respectively.

After 24 hours of exposure, the lowest concentration of rt-PA still did not affect EMP production (figure 1B). At 40 μ g/ml, rt-PA significantly enhanced EMP formation as a 78% increase was observed ($P<0.05$ versus control cells). EMP production by bEnd.3 cells exposed to the highest concentration of rt-PA (80 μ g/ml) was not different from control cells.

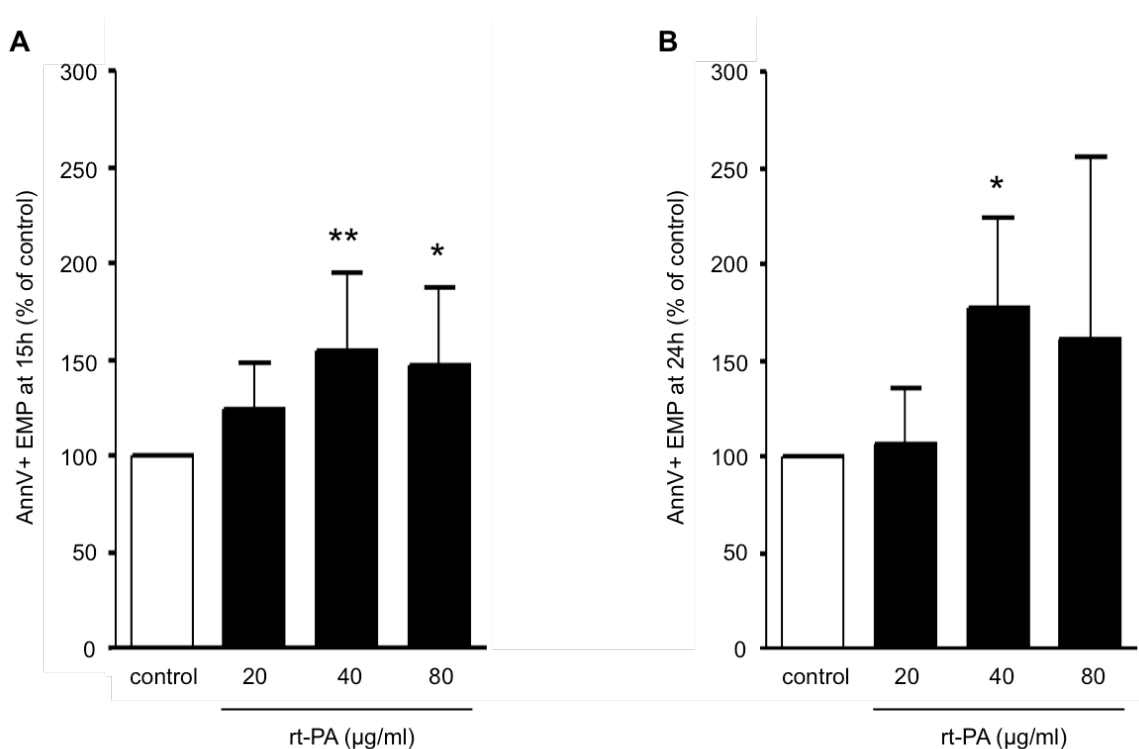


Fig.1. Effects of rt-PA on EMP production by cerebral endothelial cells (bEnd.3). bEnd.3 cells were treated with vehicle or a range of rt-PA concentrations (20, 40 or 80 μ g/ml) for 15 hours (A) or 24 hours (B). EMP were isolated from the supernatant and detected by flow cytometry. Data are presented as mean \pm SD; n=7; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ versus control cells.

Morphological changes after rt-PA exposure

In basal culture conditions, control bEnd.3 cells were evenly spread in the well as confluent, uniform, small, and oval cells (figure 2A). In the presence of rt-PA, the morphology of endothelial cells radically changed, pleomorphism was observed. bEnd.3 cells became elongated, thin and formed extensions therebetween. These effects were

more intense after both higher concentrations of rt-PA and increasing incubation time. After 24 hours of treatment, the highest concentration of rt-PA (80 $\mu\text{g/ml}$) drastically increased pleomorphism; cells were greatly aggregated and some of them were even no longer adherent to the well (figure 2A).

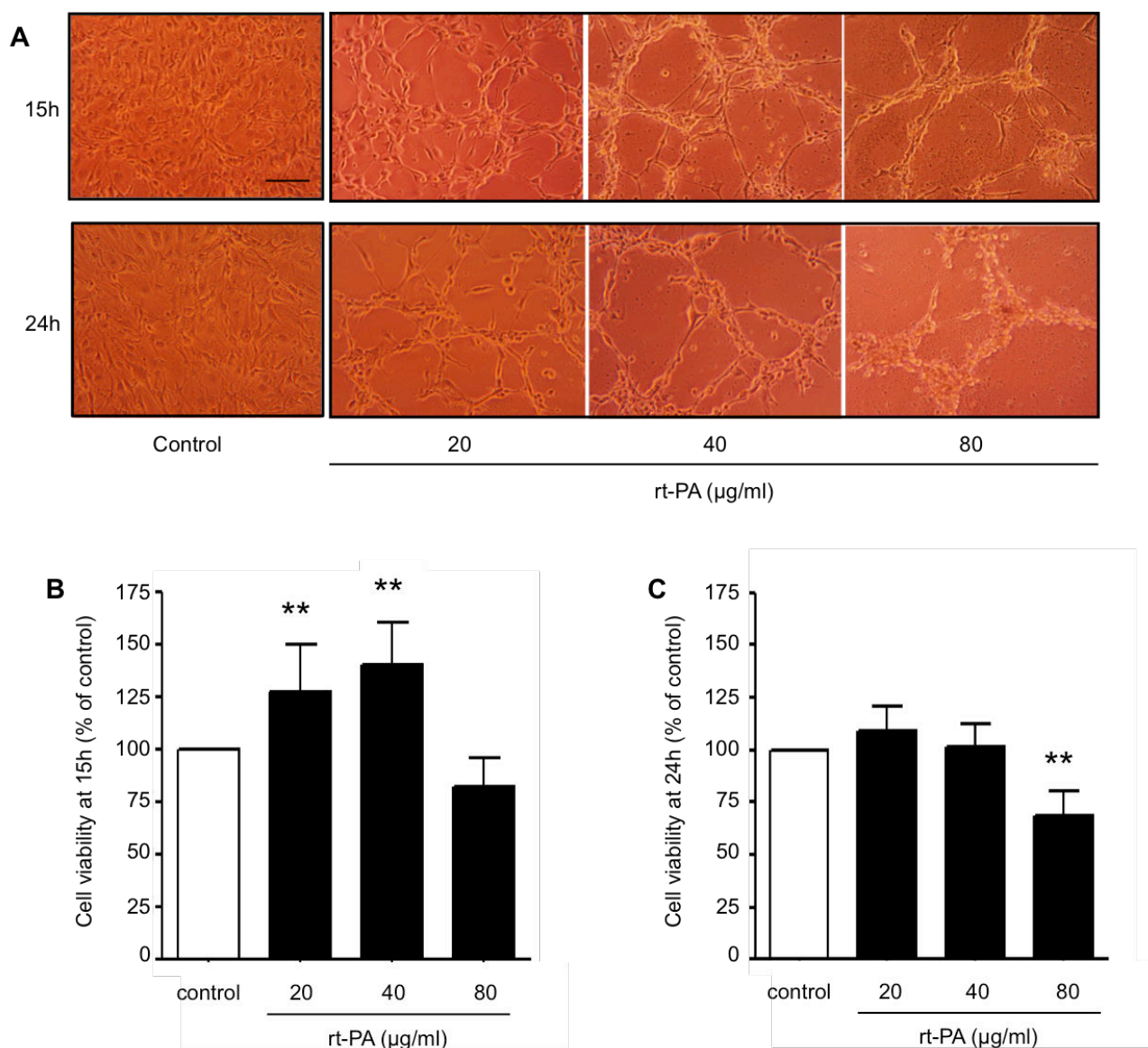


Fig.2. Effects of rt-PA on endothelial cell morphology and viability. bEnd.3 cells were incubated with vehicle or a range of rt-PA concentrations (20, 40 or 80 $\mu\text{g/ml}$) and cell morphology (**A**; representative photographs; scale bar = 100 μm) was observed 15 hours and 24 hours after treatment with a phase-inverted microscope. Viability of bEnd.3 cells was measured at 15 hours (**B**) and 24 hours (**C**) using the MTT assay. Data are presented as mean \pm SD; n=8; **P<0.01 versus control cells.

Effects of rt-PA on cell viability

After 15 hours of treatment, the cell viability was increased by the lowest concentrations of rt-PA: a 28%-increase ($P < 0.01$ versus control cells) and a 41%-increase ($P < 0.01$ versus control cells) with rt-PA at 20 $\mu\text{g/ml}$ and 40 $\mu\text{g/ml}$ respectively (figure 2B). At 80 $\mu\text{g/ml}$, rt-PA did not alter cell viability.

After a 24-hour incubation with rt-PA, the cell viability was not modified with the concentrations of 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ (figure 2C). However, at 80 $\mu\text{g/ml}$, rt-PA induced a significant reduction of 32% of the viability of bEnd.3 cells in comparison to the controls ($P < 0.01$).

As 24 hours-incubation with rt-PA at 40 $\mu\text{g/ml}$ induced maximal EMP release without affecting the viability of bEnd.3 cells, these conditions were selected to study the pathways implicated in rt-PA effect.

2) Are “classical” pathways involved in rt-PA-induced EMP production?

Effect of Z-VAD-FMK, Y27632 and SB203580 on EMP production after a 24-hour rt-PA treatment

For each of these three experiments, rt-PA induced a significant increase in EMP levels compared to control cells ($P < 0.001$, $P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively; figure 3).

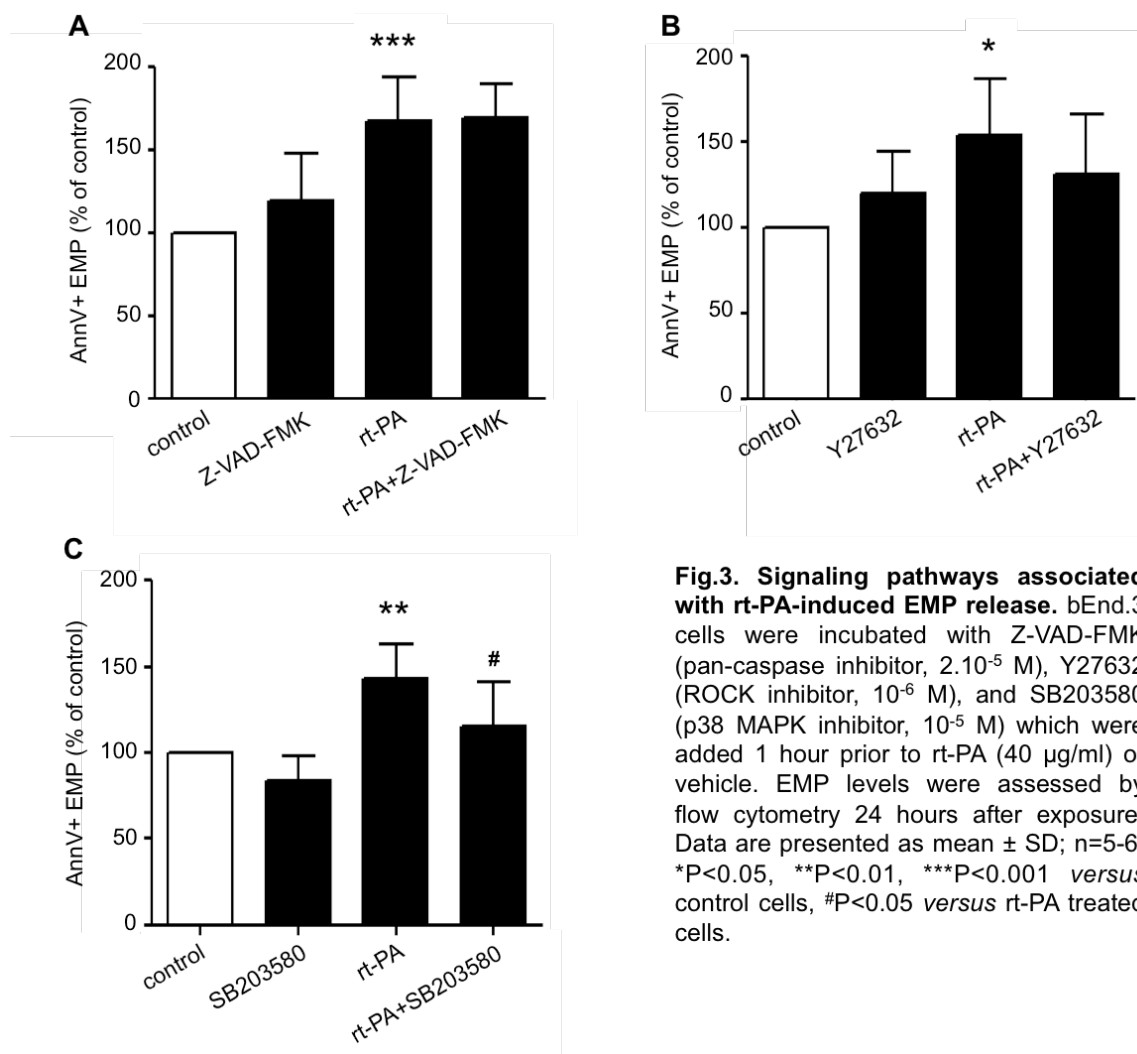


Fig.3. Signaling pathways associated with rt-PA-induced EMP release. bEnd.3 cells were incubated with Z-VAD-FMK (pan-caspase inhibitor, $2 \cdot 10^{-5}$ M), Y27632 (ROCK inhibitor, 10^{-6} M), and SB203580 (p38 MAPK inhibitor, 10^{-5} M) which were added 1 hour prior to rt-PA (40 $\mu\text{g/ml}$) or vehicle. EMP levels were assessed by flow cytometry 24 hours after exposure. Data are presented as mean \pm SD; $n = 5-6$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control cells, # $P < 0.05$ versus rt-PA treated cells.

After a 24-hour incubation, the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK did not modify the basal production of EMP nor the production of EMP induced by rt-PA (figure 3A).

Similarly, the levels of EMP at 24 hours were not modified by the Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor Y27632 compared with control cells, and the association Y27632+rt-PA did not reduce rt-PA induced EMP release (figure 3B).

When cells were incubated with SB203580, a p38-MAPK inhibitor, the EMP levels at 24 hours were not significantly different from those of control cells (figure 3C). Treatment with SB203580 significantly decreased the EMP release induced by rt-PA from $143 \pm 21\%$ to $115 \pm 26\%$ of basal values ($P < 0.05$).

Effect on cell morphology and viability

Z-VAD-FMK and Y27632 had no effect on cell morphology and cell viability, either alone or

in association with rt-PA (data not shown). SB203580 did not alter cell morphology compared to control cells (Figure 4A). However, the association SB203580+rt-PA drastically enhanced the pleomorphism and the aggregation of bEnd.3 cells. Some cells were no longer adherent to the well. Nevertheless, SB203580 had no effect on cell viability, alone and in combination with rt-PA (figure 4B).

3) Effect of PJ34, a PARP inhibitor, on rt-PA-induced EMP release

- Effect of PJ34 per se on EMP production, cell morphology and cell viability

bEnd.3 cells were incubated with a concentration range of PJ34 (from 10 to 100 μM) during 24 hours. None of the PJ34 concentration modified the basal level of EMP production (figure 5A). Moreover, PJ34 altered

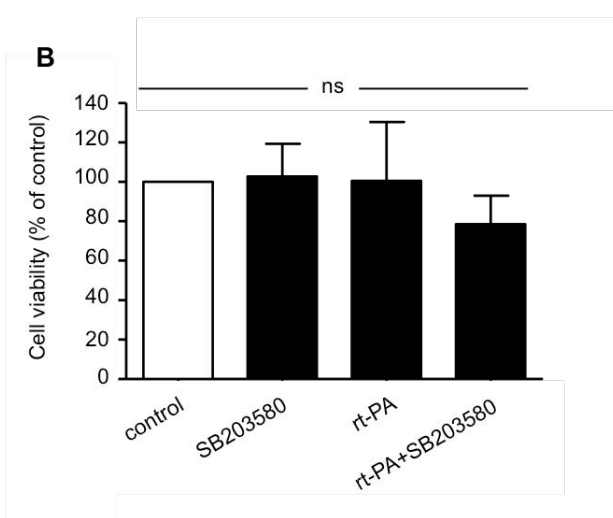
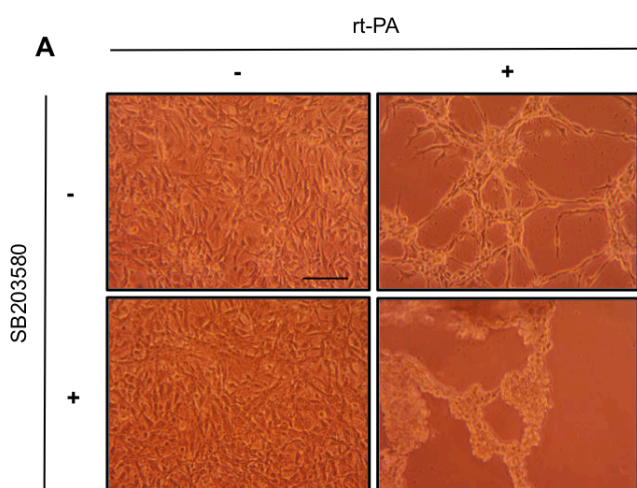


Fig.4. Effects of SB203580 combined with rt-PA on cell morphology and viability. SB203580 (p38 MAPK inhibitor, 10^{-5} M) was added 1 hour prior to rt-PA (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or vehicle. After 24 hours of incubation, cell morphology (A, representative photographs, scale bar = 100 μm) was examined with a phase-inverted microscope, and cell viability (B) was measured using the MTT test. Data are presented as mean \pm SD; n=6; ns: non significant.

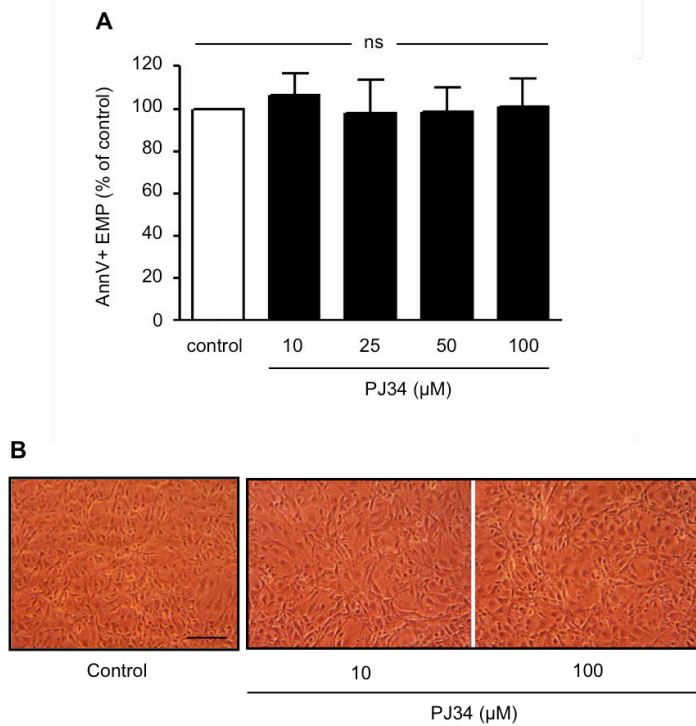
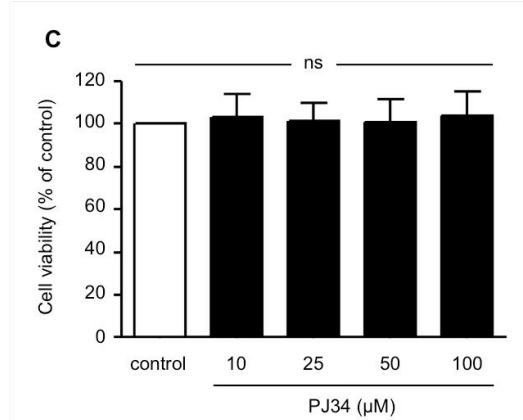
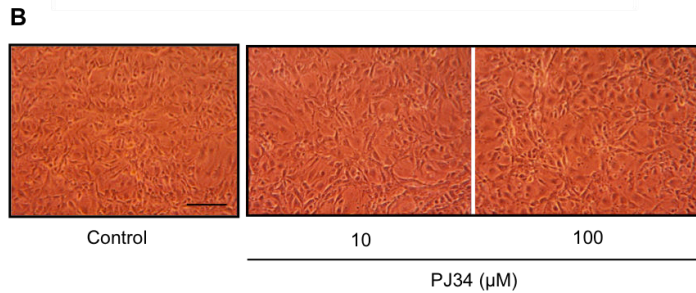


Fig.5. Effects of PJ34 per se on EMP production, cell morphology and viability. bEnd.3 cells were treated for 24 hours with a range of concentrations of PJ34 (a potent PARP inhibitor; 10, 25, 50 or 100 μM). Cell morphology (A, representative photographs, scale bar = 100 μm) was observed with a phase-inverted microscope, cell viability (B) was assessed using the MTT assay, and EMP release (C) was quantified by flow cytometry. Data are presented as mean ± SD; n=6; ns: non significant.



neither the cell morphology (figure 5B) nor the cell viability (figure 5C). Subsequent experiments were thus conducted with the lowest (10 μM) and the highest (100 μM) concentrations of PJ34.

Effect of PJ34 on morphological changes induced by rt-PA

As noticed before, incubation of bEnd.3 cells with rt-PA induced pleomorphism and extensions therebetween cells (figure 7A).

- Effects of PJ34 combined with rt-PA after a 24-hour incubation

PJ34 reduces EMP release induced by rt-PA

PJ34 at 10 or 100 μM had no effect on basal EMP levels. Rt-PA induced a 67% increase in EMP compared to controls (figure 6, P=0.001). This increase was not significantly modified by PJ34 at 10 μM. By contrast, the highest concentration of PJ34 (100 μM) significantly reduced EMP release induced by rt-PA from 167 ± 50% to 123 ± 29% (P<0.05).

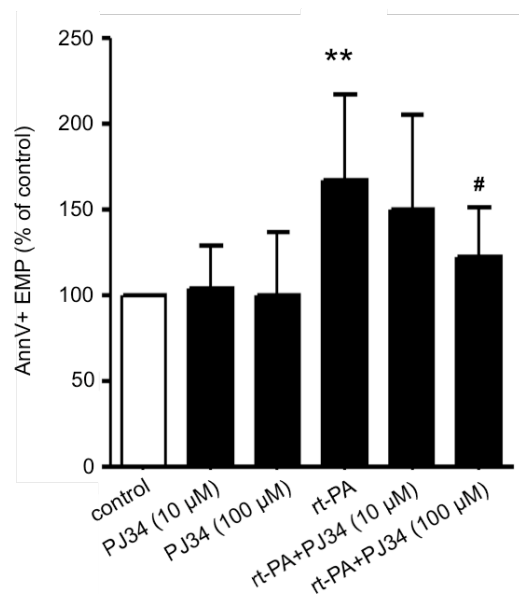


Fig.6. Effects of the association rt-PA+PJ34 on EMP release induced by rt-PA. PJ34 (PARP inhibitor, 10 or 100 μM) was added 1 hour prior to rt-PA (40 μg/ml) or vehicle. EMP levels were measured by flow cytometry 24 hours after treatment. Data are presented as mean ± SD; n=10; **P<0.01 compared with control cells, #P<0.05 compared with rt-PA treated cells.

PJ34 alone at 10 or 100 μM had no effect on cell morphology. Association of PJ34 at 10 μM to rt-PA did not alter rt-PA-induced morphological changes. However, at 100 μM , PJ34 slightly modified the morphology of rt-PA-treated cells: cells were more round and curved than cells incubated with rt-PA alone, with less extensions therebetween.

Association of PJ34 to rt-PA does not induce any change in the cell viability

As already observed in previous experiments, neither PJ34 at 10 μM and 100 μM nor rt-PA at 40 $\mu\text{g/ml}$ modified the viability (figure 7B). Furthermore, the association of rt-PA to PJ34 (10 or 100 μM) had no effect on the viability of bEnd.3 cells.

DISCUSSION

The present study demonstrates for the first time that rt-PA stimulates microparticle production by endothelial cells. This was clearly demonstrated as the increase in EMP release after rt-PA treatment has been observed in each of the 5 experiments performed on bEnd.3 cells (from 43% to 78% compared to control cells). Moreover, p38-MAPK and PARP were identified as signalling pathways implicated in this rt-PA-induced EMP production.

Experiments were performed on bEnd.3 cells, an immortalized mouse brain-derived endothelial cell line. This widely used model of cerebrovascular endothelium closely mimics primary cultures of blood brain barrier (BBB) endothelial cells [18]. Cultures of bEnd.3 cells

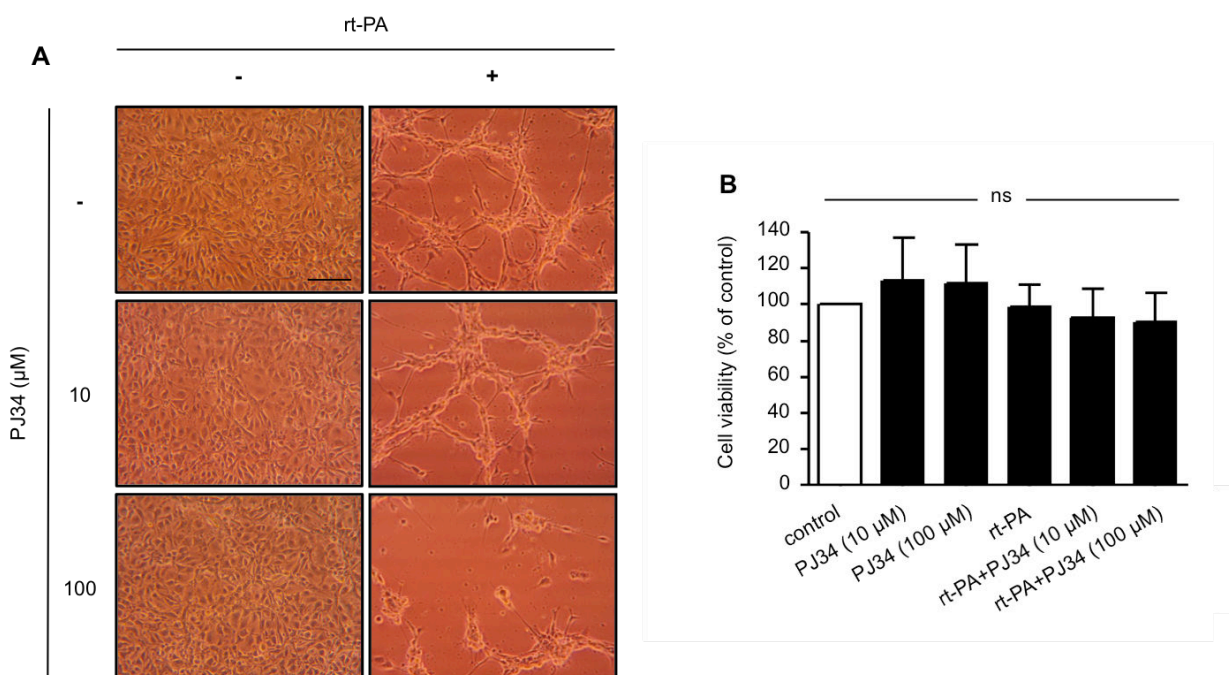


Fig.7. Effects of the association rt-PA+PJ34 on cell morphology and viability. The PARP inhibitor, PJ34 (10 or 100 μM) was added 1 hour prior rt-PA (40 $\mu\text{g/ml}$) or vehicle. After a 24-hour incubation, cell morphology (**A**, representative photographs, scale bar = 100 μm) was observed with a phase-inverted microscope, and cell viability (**B**) was measured by the MTT test. Data are presented as mean \pm SD; n=10; ns: non significant.

indeed express appropriate tight junction proteins and present interesting barrier properties [18–20]. Interestingly, it has been recently demonstrated that bEnd.3 cells respond to rt-PA as they exhibited induction of MMP through activation of lipoprotein receptor-related protein (LRP) [21], secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) [22], increase in intercellular cell adhesion molecule (ICAM-1) expression and enhanced T cells adhesion [23] after rt-PA treatment. We first studied on bEnd.3 cells the effect of a range of rt-PA concentrations on EMP production, cell morphology and viability. After a 30-minute intravenous injection of rt-PA at 10 mg/kg in rats, which corresponds to the protocol used for experimental thrombolysis, the blood concentration of rt-PA reaches 40 µg/ml [24]. In the present study, this concentration was framed by two other doses, the lowest of 20 µg/ml being the concentration of rt-PA most often encountered in studies using bEnd.3 cells [21–23]. This dose-response experiment allowed us to demonstrate that rt-PA treatment of bEnd.3 cells induced a significant increase in EMP release at the concentration of 40 µg/ml after both 15 and 24 hours of incubation.

Concerning the effect of rt-PA on cell morphology, pleomorphism was observed at both 15 and 24 hours. Moreover, bEnd.3 cells became elongated and thin and formed extensions therebetween. Little information is available regarding the effect of rt-PA on

endothelial morphology *in vitro*. Human corneal endothelial cells exposed to increasing concentrations of rt-PA for 24 hours displayed signs of cellular damage, including pleomorphism, prominent nuclei, shrunken cytosol and disruption of the intercellular junctional complexes [25]. However, in the present study, it cannot be excluded that the morphological changes noticed on bEnd.3 cells could be linked to cellular reorganisation induced by rt-PA rather than cytotoxicity. Indeed, Teng and collaborators (2012) recently reported that tPA contributes to sonic hedgehog-induced *in vitro* cerebral angiogenesis of primary mouse brain endothelial cells [26].

In our conditions (15 hours incubation with rt-PA at 20 µg/ml and 40 µg/ml), viability of bEnd.3 cells was significantly increased. These results corroborate those reporting increased proliferation of canine endothelial cells exposed to t-PA at the concentrations of 7.25, 10 and 15 µg/ml [27]. Our data also demonstrate that after 24 hours, rt-PA at 80 µg/ml induced on the contrary a significant reduction in the viability of bEnd.3 cells. These results are consistent with those of Yoeruek and collaborators which observed a dose-dependent toxic effect of rt-PA on human corneal endothelial cells, with significant cell death at concentrations higher than 125 µg/ml [25].

The effects of rt-PA reported in the present study could be attributed to the proteolytic

effect of rt-PA, or by its effect on the LRP receptor, which notably induces MMP expression [21], although it cannot be excluded that these effects may be due to plasmin released resulting from rt-PA activity on plasminogen.

To date, the exact signaling pathways involved in membrane vesiculation and EMP release remain poorly understood. Nevertheless, *in vitro* studies clearly identified the role of caspases, Rho-associated protein kinase (ROCK) and p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) as key contributors to EMP release [7,13,14]. In the present study, we thus examined the implication of these three pathways in rt-PA-induced EMP production. Our results show that rt-PA-induced EMP release in bEnd.3 cells was not affected by the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK or the ROCK inhibitor Y27632. In contrast, we demonstrated that p38-MAPK is involved in the production EMP induced by rt-PA by bEnd.3 cells. The literature reports few data regarding the existence of a link between rt-PA and p38. Armstead and collaborators reported that rt-PA administration in a model of cerebral ischemia induced by photothrombosis potentiated the activation of p38-MAPK as higher levels of phosphorylated p38 were found in the cerebrospinal fluid of rt-PA-treated ischemic animals [28]. Pineda and collaborators likewise demonstrated in primary microglial cell cultures that rt-PA

exposure results in the activation of the p38 signal transduction pathway [29].

In the present study, we also showed that the PARP inhibitor PJ34 is able to reduce rt-PA-induced EMP release. In experimental cerebral ischemia, it has been demonstrated that rt-PA administration significantly increase postischemic PARP-1 activation within ischemic hemispheres [30].

To note, involvement of p38-MAPK and PARP pathways in EMP production triggered by rt-PA can be either completely independent from each other or may be linked. Some studies indeed demonstrated that PARP activation is able to regulate MAPK cascades, including p38 [31,32].

Finally, even if p38-MAPK and PARP pathways have been identified in rt-PA-induced EMP production, implication of other mechanisms cannot be excluded.

As already mentioned, rt-PA used for thrombolysis after ischemic stroke exerts adverse effects on the vascular bed that are responsible for intracerebral bleeding [1]. To note, experimental studies have shown that EMP play a remarkable role in inflammation, enhancing leukocyte adhesion, inducing the release of pro-inflammatory cytokines and the expression of ICAM-1 and VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) by endothelial cells [33–35]. These data all together with the present results strongly suggest that EMP could mediate, at least partly, the vascular

toxicity of rt-PA. Otherwise, we recently demonstrated that PJ34 protected from rt-PA-induced intracerebral hemorrhages and BBB damages in models of cerebral ischemia [15,16]. Considering the results of the present study, the BBB protection and the decrease in hemorrhages afforded by PJ34 could likewise be linked to a reduction in the release of EMP induced by the rt-PA. This point remains to be demonstrated *in vivo*.

In clinical practice, thrombolysis is unfortunately weakly efficient. Rt-PA does not induce recanalization in all ischemic patients, and unfortunately this recanalization may be only partial [36,37]. Among the patients with recanalization, phenomena of arterial reocclusion are observed in about 30% [38,39]. Besides, as EMP express phosphatidylserine on their outer leaflet, they are able to bind and activate coagulation factors. In addition, by harboring tissue factor, EMP can initiate the extrinsic coagulation pathway [13]. It has also been demonstrated that EMP carry von Willebrand factor (vWf), and that these vWf⁺-EMP bind to platelets to induce formation of aggregates [40]. Finally, some circulating EMP phenotypic profiles reflect the risk for ischemic stroke, and are markers of stroke severity and outcome [11,12]. It is therefore possible that, following thrombolysis with rt-PA, an increased in the release of EMP may be linked to arterial reocclusions. It would therefore be of particular interest to investigate whether a correlation exists between the rate and/or the

phenotype of circulating EMP and the risk of reocclusion after thrombolysis with rt-PA in stroke patients.

In conclusion, in the present study, we clearly demonstrate that rt-PA stimulates microparticle production by endothelial cells, and we also identified p38-MAPK and PARP as pathways involved in this EMP release. Whether rt-PA may increase microparticles from other cellular origins needs to be investigated, notably for other cells from the vascular compartment where rt-PA is delivered during fibrinolysis; platelet microparticles, whose levels are increased in patients suffering from ischemic stroke [9,10], could be good candidates. Additional *in vivo* experiments are obviously needed to determine if microparticles could be used after rt-PA thrombolysis to monitor the risk of hemorrhage or reocclusion, and to strengthen the findings that PARP inhibitors may be associated with rt-PA for a safer and more effective thrombolysis.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no relevant conflict of interest to declare.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Sandra Manceau for cell culture technical assistance.

REFERENCES

- [1] Balami JS, Sutherland BA, Buchan AM. Complications associated with recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute ischaemic stroke. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013;12:155–69.
- [2] Jin R, Yang G, Li G. Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis* 2010;38:376–85. doi:10.1016/j.nbd.2010.03.008.
- [3] Vivien D, Gauberti M, Montagne A, Defer G, Touzé E. Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2011;31:2119–34. doi:10.1038/jcbfm.2011.127.
- [4] Loyer X, Vion A-C, Tedgui A, Boulanger CM. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circ Res* 2014;114:345–53. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300858.
- [5] Roos MA, Gennero L, Denysenko T, Reguzzi S, Cavallo G, Pescarmona GP, et al. Microparticles in physiological and in pathological conditions. *Cell Biochem Funct* 2010;28:539–48. doi:10.1002/cbf.1695.
- [6] Morel O, Toti F, Morel N, Freyssinet J-M. Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica* 2009;94:313–7. doi:10.3324/haematol.2009.003657.
- [7] Curtis AM, Edelberg J, Jonas R, Rogers WT, Moore JS, Syed W, et al. Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function. *Vasc Med Lond Engl* 2013;18:204–14. doi:10.1177/1358863X13499773.
- [8] Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, Blann A, Boulanger CM, Cockcroft J, et al. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil Off J Eur Soc Cardiol Work Groups Epidemiol Prev Card Rehabil Exerc Physiol* 2011;18:775–89. doi:10.1177/1741826711398179.
- [9] Anglés-Cano E, Vivien D, STROKAVENIR. [Cellular microparticles, potential useful biomarkers in the identification of cerebrovascular accidents]. *Médecine Sci MS* 2009;25:843–6. doi:10.1051/medsci/20092510843.
- [10] Liu M-L, Williams KJ. Microvesicles: potential markers and mediators of endothelial dysfunction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012;19:121–7. doi:10.1097/MED.0b013e32835057e9.
- [11] Jung K-H, Chu K, Lee S-T, Park H-K, Bahn J-J, Kim D-H, et al. Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Ann Neurol* 2009;66:191–9. doi:10.1002/ana.21681.
- [12] Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost JTH* 2006;4:1296–302. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01911.x.
- [13] Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:27–33. doi:10.1161/ATVBAHA.110.218123.
- [14] Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R, Sabatier F, Simoncini S, Njock SM, et al. Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2010;104:456–63. doi:10.1160/TH10-02-0111.
- [15] Haddad M, Beray-Berthat V, Coqueran B, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Margail I. Combined therapy with PJ34, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, reduces tissue

- plasminogen activator-induced hemorrhagic transformations in cerebral ischemia in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2013;27:393–401. doi:10.1111/j.1472-8206.2012.01036.x.
- [16] Teng F, Beray-Berthat V, Coqueran B, Lesbats C, Kuntz M, Palmier B, et al. Prevention of rt-PA induced blood-brain barrier component degradation by the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor PJ34 after ischemic stroke in mice. *Exp Neurol* 2013;248:416–28. doi:10.1016/j.expneurol.2013.07.007.
- [17] Vion A-C, Ramkhalawon B, Loyer X, Chironi G, Devue C, Loirand G, et al. Shear stress regulates endothelial microparticle release. *Circ Res* 2013;112:1323–33. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300818.
- [18] Brown RC, Morris AP, O'Neil RG. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res* 2007;1130:17–30. doi:10.1016/j.brainres.2006.10.083.
- [19] Song L, Pachter JS. Culture of murine brain microvascular endothelial cells that maintain expression and cytoskeletal association of tight junction-associated proteins. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003;39:313–20. doi:10.1290/1543-706X(2003)039<0313:COMBME>2.0.CO;2.
- [20] Watanabe T, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, et al. Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biol Pharm Bull* 2013;36:492–5.
- [21] Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Kawakami J, Lijnen HR, Umemura K. Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. *Blood* 2009;114:3352–8. doi:10.1182/blood-2009-02-203919.
- [22] Won S, Lee JH, Wali B, Stein DG, Sayeed I. Progesterone attenuates hemorrhagic transformation after delayed tPA treatment in an experimental model of stroke in rats: involvement of the VEGF-MMP pathway. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2014;34:72–80. doi:10.1038/jcbfm.2013.163.
- [23] Wang J, Zhang X, Mu L, Zhang M, Gao Z, Zhang J, et al. t-PA acts as a cytokine to regulate lymphocyte-endothelium adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol Orlando Fla* 2014;152:90–100. doi:10.1016/j.clim.2014.03.004.
- [24] Godfrey KR, Tanswell P, Bates RA, Chappell MJ, Madden FN. Nonlinear pharmacokinetics of tissue-type plasminogen activator in three animal species: a comparison of mathematical models. *Biopharm Drug Dispos* 1998;19:131–40.
- [25] Yoeruek E, Spitzer MS, Tatar O, Biedermann T, Grisanti S, Lüke M, et al. Toxic effects of recombinant tissue plasminogen activator on cultured human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1392–7. doi:10.1167/iovs.07-1079.
- [26] Teng H, Chopp M, Hozeska-Solgot A, Shen L, Lu M, Tang C, et al. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 contribute to sonic hedgehog-induced in vitro cerebral angiogenesis. *PLoS One* 2012;7:e33444. doi:10.1371/journal.pone.0033444.
- [27] Welling TH, Huber TS, Messina LM, Stanley JC. Tissue plasminogen activator increases canine endothelial cell proliferation rate through a plasmin-independent, receptor-mediated mechanism. *J Surg Res* 1996;66:36–42. doi:10.1006/jsre.1996.0369.
- [28] Armstead WM, Riley J, Kiessling JW, Cines DB, Higazi AA-R. Novel plasminogen activator inhibitor-1-derived peptide protects against impairment of cerebrovasodilation after photothrombosis through inhibition of JNK MAPK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;299:R480–5. doi:10.1152/ajpregu.00256.2010.

- [29] Pineda D, Ampurdanés C, Medina MG, Serratosa J, Tusell JM, Saura J, et al. Tissue plasminogen activator induces microglial inflammation via a noncatalytic molecular mechanism involving activation of mitogen-activated protein kinases and Akt signaling pathways and AnnexinA2 and Galectin-1 receptors. *Glia* 2012;60:526–40. doi:10.1002/glia.22284.
- [30] Crome O, Doepfner TR, Schwarting S, Müller B, Bähr M, Weise J. Enhanced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation contributes to recombinant tissue plasminogen activator-induced aggravation of ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res* 2007;85:1734–43. doi:10.1002/jnr.21305.
- [31] Racz B, Hanto K, Tapodi A, Solti I, Kalman N, Jakus P, et al. Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: a new mechanism for the cytoplasmic effect of PARP-1 activation. *Free Radic Biol Med* 2010;49:1978–88. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.026.
- [32] Veres B, Radnai B, Gallyas F, Varbiro G, Berente Z, Osz E, et al. Regulation of kinase cascades and transcription factors by a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, 4-hydroxyquinazoline, in lipopolysaccharide-induced inflammation in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:247–55. doi:10.1124/jpet.104.065151.
- [33] Angelot F, Seillès E, Biichlé S, Berda Y, Gaugler B, Plumas J, et al. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica* 2009;94:1502–12. doi:10.3324/haematol.2009.010934.
- [34] Burger D, Montezano AC, Nishigaki N, He Y, Carter A, Touyz RM. Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/ Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1898–907. doi:10.1161/ATVBAHA.110.222703.
- [35] Lee SK, Yang S-H, Kwon I, Lee O-H, Heo JH. Role of tumour necrosis factor receptor-1 and nuclear factor- κ B in production of TNF- α -induced pro-inflammatory microparticles in endothelial cells. *Thromb Haemost* 2014;112. doi:10.1160/TH13-11-0975.
- [36] Alexandrov AV, Burgin WS, Demchuk AM, El-Mitwalli A, Grotta JC. Speed of intracranial clot lysis with intravenous tissue plasminogen activator therapy: sonographic classification and short-term improvement. *Circulation* 2001;103:2897–902.
- [37] Christou I, Alexandrov AV, Burgin WS, Wojner AW, Felberg RA, Malkoff M, et al. Timing of recanalization after tissue plasminogen activator therapy determined by transcranial doppler correlates with clinical recovery from ischemic stroke. *Stroke J Cereb Circ* 2000;31:1812–6.
- [38] Alexandrov AV, Grotta JC. Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Neurology* 2002;59:862–7.
- [39] Saqqur M, Molina CA, Salam A, Siddiqui M, Ribo M, Uchino K, et al. Clinical deterioration after intravenous recombinant tissue plasminogen activator treatment: a multicenter transcranial Doppler study. *Stroke J Cereb Circ* 2007;38:69–74. doi:10.1161/01.STR.0000251800.01964.f6.
- [40] Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Cheng P, Ahn ER, et al. Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. *J Thromb Haemost JTH* 2005;3:1301–8. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01384.x.

c) Expérience complémentaire : effets du INO-1001, un second inhibiteur de PARP

Afin de confirmer le rôle de la PARP dans la libération de MPE induite par le rt-PA (40 µg/ml) à 24 heures, nous avons utilisé un autre inhibiteur puissant de l'enzyme : le INO-1001. Le PJ34 et le INO-1001 possédant des CI50 extrêmement proches (PJ34 : CI50=17 nM ; INO-1001 : CI50<10 nM), nous avons repris pour le INO-1001 les mêmes concentrations que celles du PJ34, soient 10 et 100 µM.

➤ Protocole expérimental

Une heure avant et au moment du traitement par le rt-PA (40 µg/ml), les cellules ont été traitées par l'INO-1001 à la concentration de 10 ou 100 µM (n=3/condition). Après 24 heures d'incubation, le taux de MPE libérées dans le surnageant et positives à l'AnnV a été mesuré par cytométrie en flux. De même, la morphologie et la viabilité des cellules ont été évaluées. Le taux de MPE_AnnV+ et la viabilité cellulaire sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles de chaque série.

➤ Détection des MPE

Cette étude confirme à nouveau l'effet du rt-PA (40 µg/ml) sur la libération de MPE puisque, tout comme au cours des expériences précédentes, il entraîne une augmentation des microparticules par rapport aux cellules contrôles (+48% ; P<0,05) (figure 61). L'INO-1001, à la concentration de 10 ou 100 µM, ne modifie pas la production basale de MPE par rapport aux cellules contrôles après 24 heures d'incubation. Il ne modifie pas non plus, quelle que soit sa concentration, 10 µM ou à 100 µM, la production de MPE induite par le rt-PA.

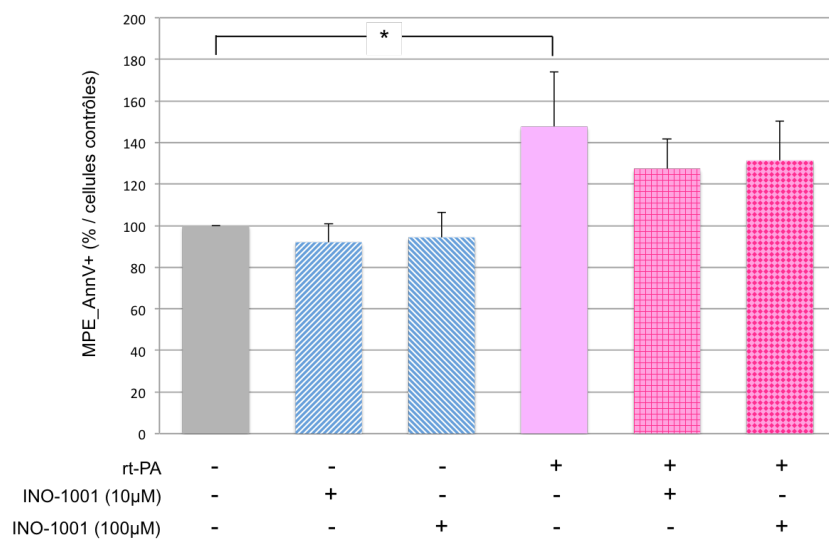


Figure 61 : Effet du INO-1001 sur la libération de MPE induite par le rt-PA après 24 heures de traitement

Les résultats (moyenne ± sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles. * : P<0,05. n=3/condition.

➤ **Étude de la morphologie des cellules**

L'effet caractéristique du rt-PA sur les cellules bEnd.3 a été retrouvé après 24 heures de traitement : les cellules, fusiformes, se regroupent, forment des amas ainsi que de nombreux prolongements entre elles (figure 62). Le INO-1001 seul n'altère pas la morphologie des cellules. La faible concentration de INO-1001 (10 μ M) ne modifie pas non plus l'aspect des cellules traitées par le rt-PA. En revanche, la forte concentration (100 μ M) atténue nettement l'effet du rt-PA : les cellules sont plus ovales et forment moins d'amas et de prolongements entre elles.

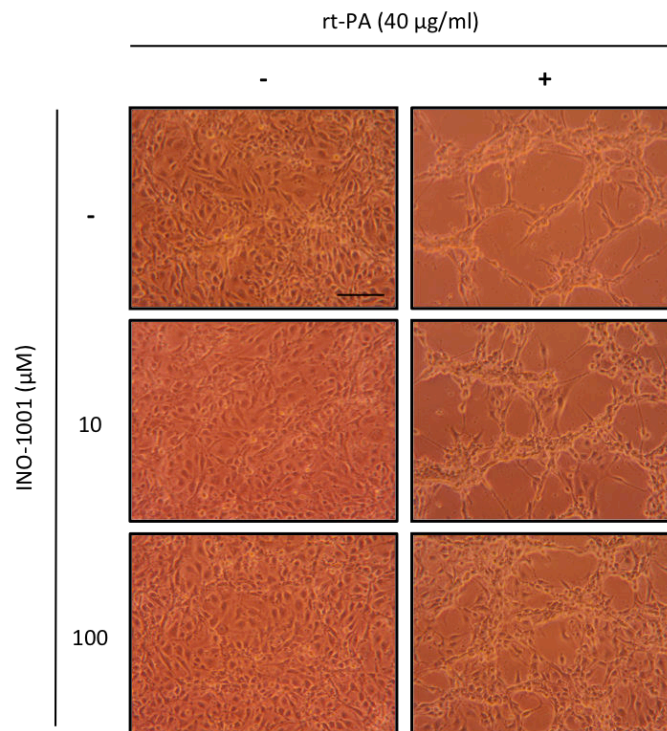


Figure 62 : Photos représentatives de l'effet du INO-1001, du rt-PA et de leur association sur la morphologie des cellules bEnd.3 après 24 heures d'incubation

La barre d'échelle représente 100 μ m.

➤ **Mesure de la viabilité cellulaire**

Après 24 heures d'incubation, ni le INO-1001 (10 ou 100 μ M), ni le rt-PA, ni même leur association ne modifient la viabilité des cellules bEnd.3 par rapport aux cellules contrôles (figure 63).

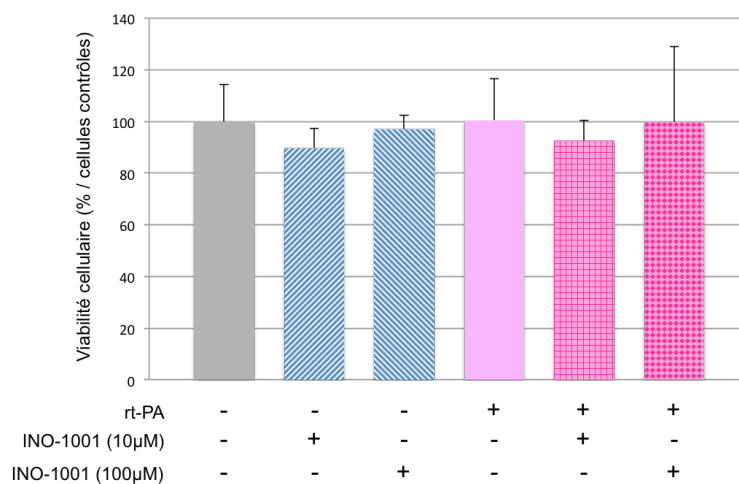


Figure 63 : Effet du INO-1001, du rt-PA et de leur association sur la viabilité des cellules bEnd.3 après 24 heures d'incubation

La viabilité cellulaire a été évaluée par un test MTT. Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles. n=3/condition.

d) Résumé des principaux résultats et discussion complémentaire

❖ L'incubation prolongée des cellules bEnd.3 avec le rt-PA induit des changements morphologiques profonds et augmente la production de MPE

En ce qui concerne la morphologie des cellules, nous avons retrouvé après 15h et 24h d'incubation l'effet caractéristique du rt-PA que nous avons observé dès 6 heures : les cellules deviennent fusiformes, émettent des prolongements entre elles, et se regroupent en amas. Cet effet du rt-PA, toujours concentration-dépendant, est plus marqué à ces temps tardifs. Dans la littérature, une seule étude rapporte un tel effet du rt-PA sur la morphologie des cellules. Dans cette étude, menée sur des cellules endothéliales de cornée, le rt-PA a entraîné des signes caractéristiques d'atteinte cellulaire (pléomorphisme, rétrécissement du cytosol, noyaux proéminents) (Yoeruek et al., 2008).

Il est à noter que l'aspect de nos cellules pourrait s'apparenter à la réorganisation qui est observée lors de la formation de structures vasculaires, ce qui laisse supposer que le rt-PA pourrait exercer un effet pro-angiogénique. L'étude de la viabilité cellulaire après 15 heures de traitement étaye cette hypothèse puisque, à ce temps, les concentrations de 20 et 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rt-PA sont à l'origine d'une prolifération cellulaire de respectivement 28 et 41%. Ce résultat est à rapprocher des travaux de Welling et al. (1996) qui ont mis en évidence que le rt-PA (7,25, 10 et 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) augmente *in vitro* la prolifération de cellules endothéliales provenant de veines jugulaires de chien.

D'autres études suggèrent que le rt-PA pourrait exercer un rôle pro-angiogénique ainsi que de remodelage vasculaire (Yip et al., 2013; Teng et al., 2012; Benarroch, 2007). Bien que les mécanismes exacts restent encore à élucider, plusieurs hypothèses sont proposées :

- Des travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* ont démontré que le rt-PA est à l'origine d'une augmentation de l'expression du VEGF (vascular endothelial growth factor) (Duan et Ni, 2014; Won et al., 2014; Zhang et al., 2013; Kanazawa et al., 2011), un puissant facteur pro-angiogénique.

- Le rt-PA pourrait également présenter un effet pro-angiogénique de manière plus indirecte, par l'activation des MMP. En effet, Suzuki et al. (2009) ont en particulier montré que le rt-PA entraîne une augmentation de la sécrétion de MMP-3 par les cellules bEnd.3, *via* l'activation du récepteur LRP, que ce soit en normoxie ou en condition OGD (oxygen glucose deprivation). Or, les MMP sont dotées d'une activité pro-angiogénique grâce à leur action protéolytique sur la matrice extracellulaire et leur capacité à recruter des progéniteurs endothéliaux (Zhao et al., 2007).

- Enfin, le rt-PA clive le plasminogène en plasmine, qui participe elle aussi à l'angiogenèse en favorisant notamment la migration des cellules endothéliales (Tarui et al., 2002).

Afin de vérifier l'effet pro-angiogénique du rt-PA dans nos conditions, il serait intéressant de réaliser une étude de la formation de pseudo-vaisseaux sur matrigel avec nos cellules bEnd.3.

De manière intéressante, à la concentration de 80 µg/ml, le rt-PA n'augmente pas la viabilité des cellules comme le font les deux autres concentrations (20 et 40 µg/ml) à 15 heures ; il devient même cytotoxique à 24 heures. Un tel effet cytotoxique du rt-PA a également été mis en évidence sur des cellules endothéliales de cornée par Yoeruek et al. (2008). Les travaux de ces auteurs montrent que le rt-PA entraîne une mort cellulaire de type apoptotique à partir de 100 µg/ml, et une mort par nécrose au delà de 200 µg/ml.

En ce qui concerne la détection des MPE, il s'agit à notre connaissance, de la première étude qui montre que le rt-PA augmente la libération de MPE par des cellules endothéliales, et notamment cérébrales. Cet effet est particulièrement marqué avec la concentration de 40 µg/ml qui augmente le taux de MPE de 55% à 15 heures et de 78% à 24 heures. Rappelons que dès 6 heures de traitement, le rt-PA tendait déjà à augmenter la production de MPE.

Il a été décrit dans la littérature que la libération de MPs peut être induite lors de l'activation des cellules ou de leur apoptose (Azevedo et al., 2007; Jimenez et al., 2003; VanWijk et al., 2003). Concernant l'effet du rt-PA sur les cellules bEnd.3, la production de MPE ne semble pas liée à une mort cellulaire puisque (1) le rt-PA à la concentration de 80 µg/ml à 24 heures est à l'origine d'une cytotoxicité qui ne s'accompagne pas d'une augmentation des MPE, et (2) à la concentration de 40 µg/ml, le rt-PA est à l'origine d'une production de MPE sans entraîner de mort cellulaire. D'autre

part, nos résultats permettent également d'écarter l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la production de MPE par le rt-PA ne soit que la conséquence d'une prolifération des cellules bEnd.3, qui, nous l'avons vu, produisent des MPE en conditions basales. En effet, à la concentration de 20 µg/ml, le rt-PA entraîne à 15 heures une prolifération cellulaire qui ne s'accompagne pas pour autant d'une augmentation de la production de MPE.

❖ **La production des MPE induite par le rt-PA est réduite par un inhibiteur de p38 et par un inhibiteur de PARP**

La seconde partie de notre étude a consisté à rechercher par quel(s) mécanisme(s) le rt-PA augmente la libération des MPE. Pour cela, nous avons décidé de travailler à la concentration de 40 µg/ml pendant 24 heures car dans ces conditions, l'effet du rt-PA sur le taux de MPE est maximal.

Dans un premier temps, nous avons étudié les mécanismes classiques de vésiculation. Nos résultats montrent que l'inhibiteur **pan-caspases**, Z-VAD-FMK, n'a pas réduit la production des MPE induite par le rt-PA ; l'apoptose ne semble donc pas contribuer à ce phénomène. De même, les **ROCK** ne sont pas non plus impliquées. En revanche, l'utilisation d'un inhibiteur de la **protéine p38**, le SB203580, diminue significativement la libération des microparticules. La protéine p38 semble donc jouer un rôle clé dans l'effet du rt-PA sur les cellules bEnd.3 dans nos conditions.

La protéine p38, qui appartient à la famille des protéines MAP Kinase (MAPK), est largement exprimée au niveau cérébral. De plus, il est établi que son activité, qui est augmentée dans les heures qui suivent une ischémie cérébrale, joue un rôle délétère dans la production de cytokines pro-inflammatoires et la mort cellulaire (voir pour revues Corrêa et Eales, 2012; Mehta et al., 2007; Barone et al., 2001). *In vitro*, une étude réalisée par Zhu et al. (2003) montre qu'après 24 heures d'hypoxie, les cellules bEnd.3 expriment 3 fois plus la protéine p38 sous forme phosphorylée (forme active) qu'en condition normoxie. Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'il a été mis en évidence que le rt-PA est à l'origine d'une augmentation de l'expression de la protéine p38 phosphorylée ; ceci a été montré *in vivo*, étude dans laquelle p38 a été détectée dans le LCR dans un modèle d'ischémie cérébrale par photothrombose chez le cochon (Armstead et al., 2010), et également *in vitro*, sur des cultures de cellules microgliales (Pineda et al., 2012). Afin de confirmer le rôle de la protéine p38 dans la production des MPE induite par le rt-PA, il serait donc intéressant de rechercher si dans nos conditions de culture des cellules bEnd.3, l'expression de la forme phosphorylée (forme active) de p38 est également augmentée en présence de rt-PA.

Dans un second temps, nous avons recherché si la **PARP** contribuait elle aussi aux effets du rt-PA sur la libération des MPE. En effet, il a été montré *in vivo* dans des modèles d'ischémie cérébrale, que le

rt-PA augmente l'activité de la PARP (Crome et al., 2007). De plus, au laboratoire, nous avons mis en évidence que la PARP participe à la toxicité vasculaire post-ischémique du rt-PA (*i.e.* aux transformations hémorragiques) (Haddad et al., 2013; Teng et al., 2013; El Amki et al., en préparation).

Nous avons tout d'abord étudié l'effet propre d'une gamme de concentrations de PJ34. Cet inhibiteur étant dénué d'effet tant sur la morphologie et la viabilité cellulaires que sur la production des MPE, nous avons pour la suite choisi de l'associer au rt-PA à la concentration la plus faible de la gamme (10 μ M) et la plus élevée (100 μ M). Nos résultats montrent que le PJ34 (100 μ M) diminue la libération de MPE induite par le rt-PA. Ainsi, cette étude est la première à suggérer le rôle de la PARP dans l'augmentation de la production de MPE induite par le rt-PA.

Afin de confirmer ce nouveau rôle de la PARP, nous avons examiné l'effet d'un autre inhibiteur de l'enzyme, le INO-1001. Au cours d'une expérience préliminaire (n=3 par condition), le INO-1001 n'a pas permis, contrairement au PJ34, de réduire la libération des microparticules induite par le rt-PA ; cette étude reste bien évidemment à confirmer. Nous envisageons également deux autres approches afin de vérifier l'implication de la PARP dans l'effet du rt-PA : l'une par siRNA (small interfering RNA) de PARP-1, l'autre en réitérant nos études sur des cultures primaires de cellules endothéliales provenant de souris PARP-1^{-/-}. Parallèlement, nous chercherons à mettre en évidence l'activation de la PARP par le rt-PA dans nos cellules, en suivant la production des poly(ADP-riboses) par Western blot. A l'issue de ces différentes études, nous pourrions conclure ou non sur le rôle de la PARP dans la production des MPE par le rt-PA. Des résultats négatifs suggèreraient fortement un effet non spécifique du PJ34, *i.e.* indépendant de la PARP, dans l'étude présentée ici. Il est à noter que récemment, des effets non spécifiques du PJ34 ont été rapportés :

- une étude a montré que le PJ34 inhibe la MMP-2 avec une CI50 de l'ordre du μ M (d'autres inhibiteurs de PARP possèdent le même effet ; le INO-1001 ne faisait pas partie de cette étude) (Nicolescu et al., 2009),
- une autre équipe a rapporté que le PJ34 inhibe, également avec une CI50 de l'ordre du μ M, l'activité des PIM kinases 1 et 2, deux sérine/thréonine kinases (Antolín et al., 2012),
- enfin, au laboratoire, Marie Lechaftois et Dominique Lerouet ont montré un effet anti-agrégant plaquettaire du PJ34 (et une absence d'effet du INO-1001). Etant donné l'absence de PARP au niveau des plaquettes (qui sont anuclées), cet effet du PJ34 ne peut qu'être PARP-indépendant (Lechaftois et al., sous presse).

Un autre point-clé dans la poursuite de ces travaux sera de compléter la cascade d'évènements mise en jeu depuis le rt-PA jusqu'à la formation des MPE, en précisant :

1) la cible endothéliale du rt-PA en amont de p38 et de la PARP. Deux candidats nous semblent envisageables :

- Tout d'abord, le récepteur NMDA, dont la présence sur les cellules bEnd.3 a été démontrée (Betzen et al., 2009; Scott et al., 2007). Rappelons qu'*in vivo*, au cours de l'ischémie cérébrale, le rt-PA entraîne l'activation de la PARP *via* la potentialisation de l'activation de ces récepteurs (Crome et al., 2007) ; ces mêmes récepteurs NMDA sont également impliqués dans l'activation de la protéine p38 (Lai et al., 2014). Il serait donc intéressant de rechercher l'effet d'un antagoniste des récepteurs NMDA tel que le MK-801 sur la production de MPE induite par le rt-PA.
- Le récepteur LRP, autre cible bien connue du rt-PA, dont l'expression a été décrite récemment au niveau des cellules bEnd.3 (J. Wang et al., 2014; Suzuki et al., 2009). L'association au rt-PA de l'antagoniste RAP (receptor-associated protein) ou d'un anticorps anti-LRP permettrait de rechercher si ce récepteur est impliqué dans la vésiculation qui fait suite au traitement par le rt-PA.

2) si, en aval, la PARP et la protéine p38 sont deux voies indépendantes, et si ce sont les seules à participer à la formation des MPE par le rt-PA. En effet, ni le PJ34, ni l'inhibiteur de p38 n'ont bloqué complètement la production de MPE par le rt-PA. Il serait intéressant de rechercher l'effet de leur association ce qui nous fournira plusieurs informations :

- si l'association des deux inhibiteurs ne supprime pas complètement l'effet du rt-PA, cela montrera que d'autres voies de signalisation sont mises en jeu dans cet effet. Le rôle d'autres effecteurs devra être recherché, en particulier ERK1/2 et les Jun-Kinases qui appartiennent, comme la protéine p38, à la famille des MAPK et dont l'implication dans les mécanismes de vésiculation a été décrite dans la littérature (Vion et al., 2013).
- si leurs effets s'avèrent être additifs, cela suggèrera qu'ils agissent sur deux voies de signalisation parallèles et indépendantes.
- Si leurs effets ne s'additionnent pas, cela signifiera que les deux voies sont liées, ce que nous n'excluons pas. En effet, des études ont montré que la PARP est impliquée dans la régulation de l'expression de la protéine p38 dans des modèles *in vivo* et *in vitro* d'inflammation et de stress oxydant (Racz et al., 2010; Ha, 2004; Veres et al., 2004).

3) Enfin, il nous faudra préciser les effecteurs intervenant en aval de la PARP et de la protéine p38. A la suite de l'ischémie cérébrale, ces deux protéines ont comme point commun d'être à l'origine, *via* notamment l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1, d'une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF et l'IL-1 β (Erdélyi et al., 2005; Barone et al., 2001); or, les cytokines sont de bons inducteurs de la production de MPs. Même si nos résultats ne sont pas en faveur d'une réaction inflammatoire à la suite du traitement par le rt-PA (pas de surexpression de VCAM-1 et d'ICAM-1) et si nous n'avons pas mis en évidence de production de MPE avec le TNF, il serait néanmoins pertinent de rechercher le rôle d'IL-1 β dans les effets que nous avons observés.

Dans la suite de nos études, nous avons cherché à transposer ce modèle de culture cellulaire dans un environnement mimant les conditions d'une ischémie cérébrale. La mise en place d'expériences en milieu dépourvu en glucose et oxygène (OGD) n'étant pas réalisable au laboratoire, nous avons choisi de reproduire dans un premier temps le stress excitotoxique qui survient précocement à la suite de l'ischémie ; les cellules ont donc été cultivées en présence de glutamate.

V. Effet du rt-PA sur les cellules bEnd.3 en présence de glutamate

Au cours de l'ischémie cérébrale, l'un des premiers mécanismes mis en jeu est l'excitotoxicité, qui est liée à une libération massive de glutamate. Cet acide aminé excitateur, en se fixant notamment sur ses récepteurs NMDA, est à l'origine d'un stress excitotoxique particulièrement délétère pour les cellules cérébrales. Par ailleurs, il est désormais bien établi que le rt-PA potentialise l'activation des récepteurs NMDA, ce qui aggrave les mécanismes excitotoxiques à la suite de l'ischémie notamment. Ainsi, nous avons cherché à examiner sur les cellules bEnd.3 l'effet du glutamate et les conséquences de son association avec le rt-PA. Les cellules bEnd.3 semblent être un bon modèle d'étude puisque plusieurs travaux ont confirmé l'existence des récepteurs NMDA sur les cellules bEnd.3 (Betzen et al., 2009; Scott et al., 2007).

1. Etude préliminaire : effet propre du glutamate sur la libération des MPE

En l'absence de données dans la littérature de l'effet du glutamate sur la libération de microparticules, nos travaux ont consisté dans un premier temps à évaluer les effets d'une gamme de concentrations de glutamate (5, 20 et 50 mM) sur la production de MPE par les cellules bEnd.3 après 24 heures de traitement. Cette gamme de concentrations a été définie d'après l'étude de Scott et al. (2007) qui a évalué l'effet de différentes concentrations de glutamate allant de 0,001 à 100 mM

sur la viabilité des cellules bEnd.3 à 24 heures. Cette étude a mis en évidence un effet cytotoxique dès 30 mM. Notons qu'au laboratoire, le Dr Teng a par la suite confirmé ces résultats en montrant une diminution de la viabilité des cellules bEnd.3 à 24 heures en présence de glutamate à la concentration de 50 mM. Aussi, nous avons choisi la concentration de 50 mM comme valeur haute de la gamme ainsi que deux concentrations plus faibles, 5 et 20 mM.

➤ Protocole expérimental

Les cellules ont été traitées par une gamme de concentrations de glutamate (5, 20 ou 50 mM). Après 24 heures d'incubation, le taux de MPE a été évalué par cytométrie en flux après un marquage à l'AnnV. Le taux de MPE_AnnV+ de chaque échantillon est exprimé en pourcentage par rapport aux cellules contrôles de chaque série (n=3-6/condition).

➤ Résultats

Nos résultats montrent qu'aucune des concentrations de glutamate (5, 20 ou 50 mM) ne modifie les taux de MPE par rapport aux cellules contrôles (figure 64).

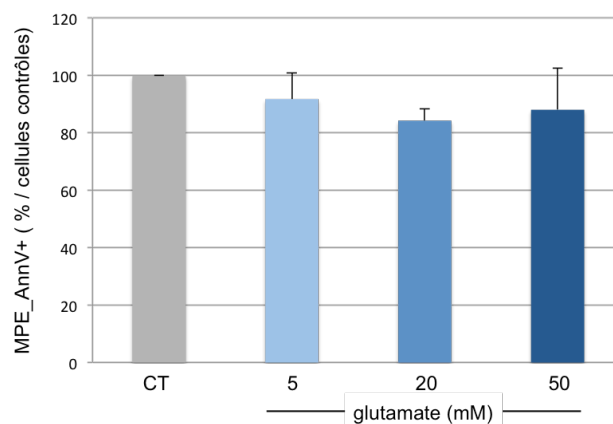


Figure 64 : Effet glutamate sur la libération des MPE par les cellules bEnd.3 après 24 heures d'incubation

Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles. n=3-6/condition ; CT : cellules contrôles.

➤ Discussion

Nos résultats montrent que quelle que soit sa concentration, le glutamate n'augmente pas la production de MPE par rapport aux conditions basales.

L'étape suivante de notre travail a consisté à rechercher si le rt-PA pouvait potentialiser les effets du glutamate en terme de viabilité et de morphologie cellulaires, et les conséquences de l'association des deux composés sur la production de MPE. Pour cela, nous avons retenu la concentration de

50 mM de glutamate qui avait été démontrée cytotoxique au laboratoire, et la concentration de 40 µg/ml de rt-PA.

2. Effet du rt-PA sur les cellules endothéliales cérébrales en présence de glutamate

a) Protocole expérimental

Les cultures ont été réparties en 4 groupes :

- cellules contrôles
- cellules traitées par le glutamate (50 mM)
- cellules traitées par le rt-PA (40 µg/ml)
- cellules traitées par l'association glutamate (50 mM) + rt-PA (40 µg/ml)

Après 15 heures et 24 heures d'incubation, le taux de MPE libérées dans le surnageant et positives à l'AnnV a été mesuré par cytométrie en flux. De même, la morphologie et la viabilité des cellules ont été évaluées. Le taux de MPE_AnnV+ et la viabilité cellulaire sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles de chaque série (n=7-8/condition).

b) Résultats

➤ Étude de la viabilité cellulaire

Après 15 heures de traitement, le glutamate ne modifie pas la viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles, tandis que le rt-PA entraîne une augmentation de 41% ($P < 0,001$) (figure 65.A). L'association du rt-PA au glutamate augmente significativement la viabilité cellulaire par rapport au glutamate (respectivement : $140 \pm 16,8\%$ versus $85 \pm 14,3\%$, $P < 0,001$).

Après 24 heures de traitement, le glutamate est à l'origine d'une diminution de 30% de la viabilité cellulaire par rapport aux cellules contrôles ($P < 0,001$) (figure 65.B). De nouveau, lorsque le rt-PA est associé au glutamate, il entraîne une augmentation significative de la viabilité cellulaire par rapport au glutamate (respectivement : $105 \pm 7,9\%$ versus $70 \pm 17,8\%$, $P < 0,001$).

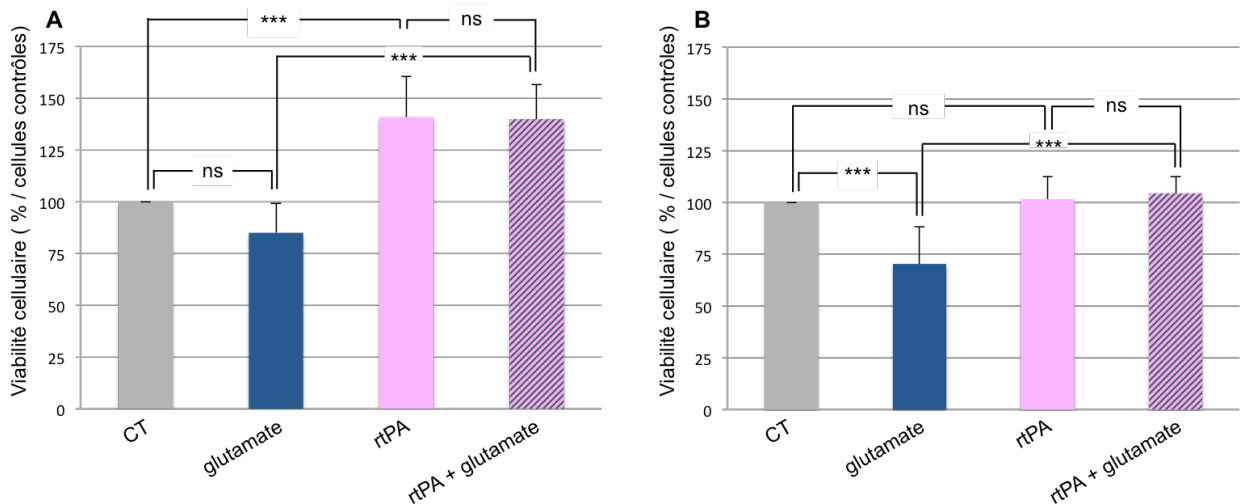


Figure 65 : Effet du rt-PA, du glutamate et de leur association sur la viabilité cellulaire après 15 heures et 24 heures d'incubation

Les cellules ont été traitées par du glutamate (50 mM) et/ou du rt-PA (40 µg/ml). La viabilité cellulaire a été évaluée par un test MTT après 15 heures (A) et 24 heures (B) de traitement. Les résultats (moyenne ± sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles. *** : $P < 0,001$; ns : non significatif ; CT : cellules contrôles. $n = 8$ /condition.

➤ **Evaluation de la morphologie de cellules**

Le glutamate ne modifie pas la morphologie des cellules après 15 ou 24 heures d'incubation (figure 66). L'effet caractéristique du rt-PA sur la morphologie des cellules bEnd.3 est retrouvé après 15 heures de traitement, et cet effet est encore plus marqué à 24 heures. En revanche, l'association du glutamate au rt-PA ne modifie pas cet aspect caractéristique.

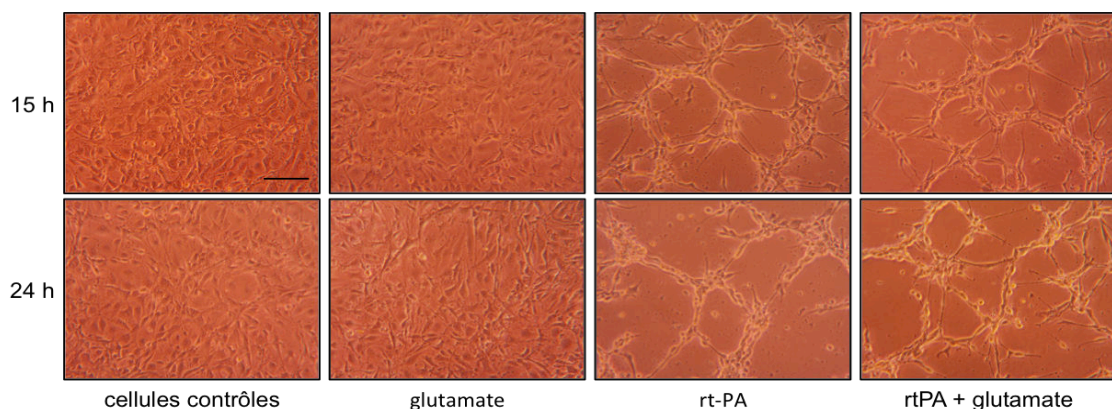


Figure 66 : Photos représentatives de l'effet du rt-PA, du glutamate et de leur association sur la morphologie des cellules bEnd.3 après 15 heures et 24 heures d'incubation

La barre d'échelle représente 100 µm.

➤ Détection des MPE

Après 15 heures de traitement, le glutamate ne modifie pas la libération des MPE par rapport aux cellules contrôles, tandis que le rt-PA entraîne une augmentation de 55% ($P=0,0012$) (figure 67.A). L'association du rt-PA au glutamate diminue significativement le taux de MPE par rapport au rt-PA (respectivement : $111 \pm 17,9\%$ versus $155 \pm 41,1\%$, $P=0,0112$).

Après 24 heures de traitement, le glutamate n'a pas d'effet sur la libération des MPE (figure 67.B). De nouveau, le rt-PA augmente de manière importante la production de MPE (+78% par rapport aux cellules contrôles, $P<0,01$). Lorsque le glutamate est associé au rt-PA, il entraîne une diminution significative de l'effet du rt-PA (respectivement : $123 \pm 55,8\%$ versus $178 \pm 46,7\%$, $P<0,05$).

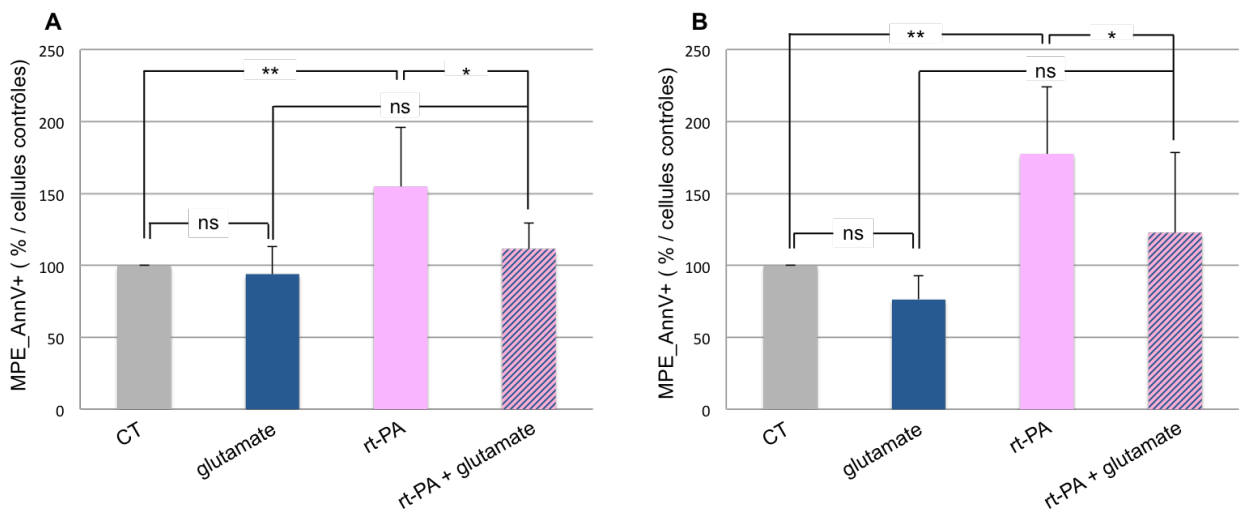


Figure 67 : Effet du rt-PA, du glutamate et de leur association sur la libération des MPE après 15 heures et 24 heures d'incubation

Les cellules ont été traitées par du glutamate (50 mM) et/ou du rt-PA (40 $\mu\text{g/ml}$) pendant 15 heures (A) et 24 heures (B). Les résultats (moyenne \pm sd) sont exprimés en % par rapport aux cellules contrôles. * : $P<0,05$; ** : $P<0,01$; ns : non significatif ; CT : cellules contrôles. $n=7$ /condition.

c) Discussion

Le glutamate est un acide aminé exciteur libéré en forte quantité au cours de l'ischémie cérébrale. En se fixant notamment sur ses récepteurs NMDA, il est à l'origine d'un stress excitotoxique qui conduit à une mort cellulaire, un stress oxydant ainsi qu'à une réaction inflammatoire (voir Préambule, Rappels bibliographiques).

Dans nos conditions de culture, le glutamate après 24 heures de traitement est à l'origine d'une diminution de 30% de la viabilité des cellules bEnd.3. Cette cytotoxicité avait déjà été mise en évidence au laboratoire par le Dr Teng qui a montré que le glutamate à 50 mM entraîne une mort des cellules bEnd.3 de l'ordre de 40% à 24 heures. Scott et al. (2007) ont quant à eux noté une

mortalité des cellules bEnd.3 de près de 60% en présence de cette même concentration de glutamate. Il est à noter que la morphologie des cellules encore présentes à 24 heures n'est pas modifiée par le glutamate (50 mM).

Contrairement à notre hypothèse de départ, lorsque le rt-PA est associé au glutamate pendant 24 heures, il ne potentialise pas la mort cellulaire induite par le glutamate, mais s'oppose au contraire totalement à cette cytotoxicité. Ce résultat est à rapprocher de l'étude de Zhang et al. (2013) qui ont montré que la mortalité des cellules HUVEC induite en condition OGD est supprimée par le rt-PA, notamment à la concentration de 40 µg/ml.

Les raisons de l'effet « protecteur » du rt-PA vis-à-vis du glutamate sur la viabilité cellulaire à 24 heures nous sont encore inconnues. Néanmoins, comme après 15 heures de traitement le rt-PA est à l'origine d'une augmentation importante de la viabilité cellulaire, il se pourrait que cette prolifération cellulaire compense l'effet toxique du glutamate à 24 heures.

Concernant l'effet du glutamate sur la production de microparticules, nos résultats confirment ceux obtenus lors de l'étude précédente : il n'augmente pas la libération de MPE, que ce soit après 15 heures ou 24 heures de traitement. Par contre, de manière intéressante, le glutamate diminue significativement la libération de MPE induite par le rt-PA, à 15 comme à 24 heures. Ce résultat est particulièrement surprenant au vu des deux effecteurs, la protéine p38 et la PARP, précédemment identifiés comme étant impliqués dans la vésiculation induite par le rt-PA ; en effet, il est décrit dans la littérature que:

- la protéine p38 est activée lors de la fixation du glutamate sur ses récepteurs NMDA (Corrêa et Eales, 2012),
- la PARP est activée en réponse aux cassures de l'ADN provoquées par un stress excitotoxique. De plus, des travaux réalisés *in vivo* ont mis en évidence que le rt-PA augmente l'activité de la PARP *via* les récepteurs NMDA (Crome et al., 2007).

Ainsi, l'interaction entre le rt-PA et le glutamate, ainsi que les effets inattendus qui en découlent, en particulier au niveau de la production des MPE, nécessitent encore d'être précisés et mériteraient d'être plus largement investigués.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A l'heure actuelle, la thrombolyse par le rt-PA demeure l'unique traitement pharmacologique disponible pour les AVC ischémiques. Néanmoins, seule une minorité de patients (<2%) peuvent en bénéficier, en raison de ses nombreuses contre-indications et de son étroite fenêtre thérapeutique. De plus, chez les patients thrombolysés, le taux d'efficacité du rt-PA est faible (recanalisation et/ou reperfusion le plus souvent incomplètes) et son administration est associée à une aggravation des transformations hémorragiques post-ischémiques (TH). La recherche des mécanismes qui sous-tendent cette toxicité vasculaire du rt-PA, en particulier au niveau de l'endothélium, permettra à terme de répondre aux enjeux actuels qui concernent notamment : (1) l'augmentation de la fenêtre thérapeutique du rt-PA, (2) l'amélioration de l'efficacité de la thrombolyse, (3) la diminution du risque de TH. Ainsi, mon travail de thèse s'intègre dans cette thématique et complète les travaux antérieurs réalisés au laboratoire par les Dr Haddad, Teng et El Amki. Je me suis intéressée plus spécifiquement aux effets délétères du rt-PA au niveau de l'endothélium, afin de préciser les mécanismes susceptibles de contribuer aux TH ainsi qu'aux phénomènes d'hypoperfusion-réocclusion, avec un intérêt tout particulier pour le rôle de la PARP.

❖ La première partie de mon travail a été réalisée *in vivo* dans un modèle expérimental d'ischémie cérébrale par injection de thrombine dans l'ACM. Ce modèle présente l'avantage d'être proche de la clinique et de permettre, contrairement aux modèles d'ischémie par occlusion mécanique, l'intégration et l'étude, de l'effet thrombolytique du rt-PA (Orset et al., 2007). Dans ce modèle, l'administration tardive de rt-PA (4 heures après le début de l'ischémie) n'entraîne pas d'amélioration fonctionnelle, ce qui correspond bien à ce qui est observé en clinique lorsque le rt-PA est administré au-delà de sa fenêtre thérapeutique ; en revanche, une aggravation des TH et une hypoperfusion ont pu être observées (El Amki et al., 2012 ; Garcia-Yébenes et al., 2011). Ces différents effets délétères du rt-PA ont été corrigés par un inhibiteur de PARP, le PJ34. Dans ce modèle, l'hypoperfusion qui fait suite à la thrombolyse tardive par le rt-PA se manifeste par un DSC qui reste au deçà de 40% du DSC initial dans le territoire situé en aval de l'occlusion de l'ACM au cours des 2 heures qui suivent l'administration de rt-PA. Il est à noter qu'il serait intéressant de compléter ces travaux, réalisés au laboratoire par laser doppler (El Amki et al., 2012), par l'étude de la perfusion du tissu cérébral à l'aide d'une technique d'imagerie plus novatrice telle que la microscopie intravitale ou le laser Speckle. Ces résultats montrent nonobstant, à tout le moins, un manque d'efficacité du rt-PA dans ces conditions. Si ces travaux suggèrent que le rt-PA ne s'oppose

pas au phénomène de « no reflow » post-ischémique, nous nous sommes interrogés sur la possibilité que le rt-PA puisse même à l'inverse participer à ce no reflow.

Dans un premier temps, nous avons recherché si l'hypoperfusion pouvait être liée à **la présence de micro-thrombi secondaires** issus de la fragmentation du caillot initial et/ou formés *in situ* après activation de la cascade de la coagulation par le rt-PA. Cependant, après 24 heures d'ischémie, nous n'avons pas observé après administration de rt-PA d'augmentation de la quantité de fibrine à distance du site de l'occlusion de l'artère. L'analyse des résultats obtenus dans le cœur de la lésion est plus complexe, car il est difficile de faire la part entre la fibrine du caillot (qui est soit liée à l'injection de thrombine, soit libérée au cours de la fragmentation du caillot par l'action du rt-PA) et celle formée plus tardivement à l'occasion d'une atteinte endothéliale. Il est à noter que l'administration combinée du PJ34 au rt-PA ne modifie pas non plus les taux de fibrine. Avant de conclure quant aux effets du rt-PA et du PJ34, il nous apparaît nécessaire de compléter cette étude par une autre technique d'analyse des dépôts de fibrine telle que l'immunohistochimie, qui permettra de localiser précisément la présence de fibrine et, contrairement au Western blot, de distinguer la fibrine contenue dans les macrovaisseaux (ACM) de celle obstruant les microvaisseaux.

Dans un deuxième temps, j'ai recherché si le rt-PA exacerbait **la réaction inflammatoire** post-ischémique au niveau des vaisseaux. En effet, la réaction inflammatoire au niveau de l'endothélium est à l'origine de l'expression de molécules d'adhésion favorisant la fixation des leucocytes à l'endothélium vasculaire ; les leucocytes adhérant peuvent non seulement obstruer les vaisseaux et entraver la reperfusion, mais ils libèrent également des médiateurs qui peuvent être délétères pour les cellules endothéliales, la BHE et favoriser la survenue de TH. Mes travaux ont montré que le rt-PA ne potentialise pas la surexpression post-ischémique de VCAM-1 et d'ICAM-1, deux marqueurs endothéliaux d'inflammation. De manière intéressante, au cours de nos études *in vitro*, nous n'avons pas non plus mis en évidence d'effet du rt-PA sur l'expression de ces deux marqueurs. Ceci n'est donc pas en faveur d'un rôle pro-inflammatoire du rt-PA. Il serait cependant intéressant de poursuivre ces travaux en examinant l'effet du rt-PA sur d'une part, des marqueurs tels que les E- et P-sélectines qui sont des molécules d'adhésion impliquées plus précocement dans l'adhésion leucocytaire, et d'autre part, sur la présence éventuelle de leucocytes piégés et/ou d'amas leucoplaquettaires au niveau des microvaisseaux. De telles études, qui seraient réalisées par immunohistochimie (marquage de CD45 pour les leucocytes, CD41 pour les plaquettes), pourraient apporter par la même des informations intéressantes quant à la présence de micro-thrombi et, associées à un marquage en dextran-FITC, permettraient d'examiner en parallèle la perfusion microvasculaire (L. Zhang et al., 2009 ; Hase et al., 2012).

Notre étude est par ailleurs la première à avoir recherché le rôle de la PARP dans l'expression de VCAM-1 au cours de l'ischémie cérébrale ; de manière très intéressante, l'inhibition de la PARP a permis de réduire les taux de VCAM-1 chez les animaux ischémiés traités par le rt-PA. Là encore, il serait intéressant de rechercher si cette réduction de VCAM-1 est associée à une diminution de l'adhésion leucocytaire qui pourrait contribuer à la meilleure reperfusion lors de la thrombolyse sous PJ34.

Notons que très récemment, une étude réalisée par le Dr El Amki dans le modèle par injection de thrombine a montré que l'ischémie est à l'origine d'une **vasoconstriction** importante de l'ACM à 24 heures (El Amki et al., en préparation). De manière très intéressante, alors que ce vasospasme n'est réduit ni par le rt-PA seul, ni par le PJ34 seul, leur association augmente significativement le diamètre du vaisseau. Cet effet pourrait aussi expliquer en partie l'amélioration de la reperfusion lorsque l'inhibiteur de PARP est associé au thrombolytique.

❖ Parallèlement aux études réalisées *in vivo*, nous avons développé la culture d'une lignée de cellules endothéliales cérébrales murines bEnd.3, afin de préciser les mécanismes de la toxicité vasculaire du rt-PA. Nos travaux montrent que le rt-PA modifie profondément la morphologie des cellules endothéliales et leur organisation. Il faut noter que la déstructuration du tapis cellulaire induite par le rt-PA n'est pas associée à une dégradation des protéines de jonctions endothéliales puisqu'il ne modifie ni l'expression de la VE-cadhérine, ni celle de l'occludine. Cependant, des études ont montré que la perte de l'intégrité des jonctions inter-endothéliales pouvait résulter de leur phosphorylation ou de leur relocalisation cytoplasmique plutôt que de leur dégradation (Seok et al., 2013; Beard et al., 2011, 2012). Quoiqu'il en soit, un effet similaire du rt-PA *in vivo* sur l'architecture du vaisseau pourrait contribuer aux TH induites par ce thrombolytique à la suite de l'ischémie.

La partie la plus originale de ce travail est sans nul doute celle qui concerne les **microparticules**. Quelques études ont rapporté une augmentation des taux plasmatiques de MPE chez les patients victimes d'un AVC ischémique (voir Rappels bibliographiques, Chapitre II). Hormis l'étude de Simak et al. (2006) qui rapporte sur un très faible nombre de patients l'absence de corrélation significative entre la présence de microparticules endothéliales plasmatiques (quel que soit leur phénotype) et l'administration de rt-PA à la suite d'un AVCi, aucun travail approfondi en clinique, et aucun en préclinique n'a, à notre connaissance, recherché la capacité du rt-PA à induire la vésiculation des cellules endothéliales. Si, pour le moment, nos essais *in vivo* n'ont pas été concluants, nos études *in vitro* ont clairement démontré (et ce, dans plusieurs expériences indépendantes) une augmentation de la production de MPE dans le surnageant des cellules bEnd.3 traitées par le rt-PA.

Nos résultats montrent par ailleurs que cette production de MPE par le rt-PA peut être réduite par un inhibiteur de p38 et par un inhibiteur de PARP.

Il sera important de compléter ces travaux par l'étude de l'effet du rt-PA sur des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales. Même si la mise en place de telles cultures est délicate, ces expériences sur ces cellules endothéliales non immortalisées permettront de confirmer l'effet du rt-PA sur la libération de microparticules et les voies de signalisation mises en jeu dans cette vésiculation, en ayant notamment recours à des cellules endothéliales provenant de souris PARP-1^{-/-}.

Nous avons également recherché l'effet du rt-PA dans des conditions se rapprochant plus de l'ischémie cérébrale, *i.e.* lors d'un stress excitotoxique ; les résultats paradoxaux que nous avons observés (réduction du taux de MPE produites par le rt-PA sous glutamate) soulèvent plus de questions qu'ils n'apportent de réponses. Il serait donc particulièrement nécessaire de faire ces études en milieu dépourvu en glucose et en oxygène (OGD) afin de mimer au mieux *in vitro* les conditions ischémiques.

Un autre point à préciser concerne le phénotype des MPE induites par le rt-PA, qui pourra être caractérisé en évaluant le profil d'expression de leurs marqueurs membranaires, et le rôle de ces MPE. Il sera en effet intéressant de comprendre si, outre refléter une altération endothéliale, les MPE contribuent aux effets délétères du rt-PA. Les MPE ne sont-elles en effet que l'un des résultats de la réorganisation cellulaire observée sous rt-PA ou en sont-elles responsables ? L'une des premières expériences pour répondre à cette question consistera à isoler les MPE libérées dans le surnageant de culture après traitement par le rt-PA et à les mettre en présence de cellules bEnd.3 « naïves ».

Il nous faudra également transposer ces études *in vitro* dans le modèle *in vivo* d'ischémie cérébrale par injection de thrombine. Dès lors que le protocole de détection des MPs circulantes sera établi, plusieurs études pourront être envisagées :

- Il sera tout d'abord important d'évaluer si, comme en clinique, l'ischémie augmente la libération de MPs dans la circulation sanguine. Nous rechercherons également si une administration tardive de rt-PA (4 heures) augmente les taux plasmatiques de MPs. Hormis la détection de MPs circulantes, nous pourrions également chercher à détecter les MPs présentes au sein du parenchyme cérébral ; il est possible que l'on puisse y retrouver des MPs d'origine endothéliale et plaquettaire qui auraient pu franchir la BHE, ou encore des MPs issues de neurones ou de cellules gliales.

- Si l'ischémie et/ou le rt-PA augmente la libération de MPs, la seconde étape consistera à rechercher l'origine cellulaire de ces MPs, endothéliale ou plaquettaire notamment, et leur phénotype.
- Nous chercherons ensuite les rôles éventuels des MPs libérées *in vivo* dans les mécanismes d'inflammation, de thrombose ou encore de vasoréactivité endothéliale. Des tests tels que le test de génération de thrombine, ainsi que les techniques mises au point au cours de cette thèse (IHC de fibrine, de VCAM-1, d'ICAM-1 ...) nous aideront à répondre à cette question. Il est à noter qu'une étude clinique suggère une association possible entre la présence de certaines microparticules endothéliales (VE-cadhérine⁺_endogline⁺) et les transformations hémorragiques (Simak et al., 2006). Si ces MPs sont dotées de tels effets, ces vésicules pourraient alors contribuer aux effets délétères du rt-PA et jouer un rôle dans la survenue des TH ou des phénomènes d'hypoperfusion - réocclusion. Nous n'excluons pas cependant que les MPs qui seraient libérées à la suite de l'ischémie et/ou d'une administration de rt-PA pourraient présenter à l'inverse, des effets bénéfiques. Une étude a en effet montré que des MPs d'origine plaquettaire administrées au cours d'une ischémie cérébrale chez le rat, entraînent un effet protecteur en participant à l'angiogenèse et à la neurogenèse (Hayon et al 2012).

En conclusion, une caractérisation approfondie des MPs libérées au cours de l'ischémie en présence ou non de rt-PA, et de leur rôle représente un axe de recherche particulièrement prometteur. D'une part, si les études précliniques puis cliniques confirment que les MPE sont le reflet d'un endothélium lésé à la suite de l'ischémie, et que leur taux circulant est proportionnel à l'atteinte endothéliale post-ischémique, alors les MPE pourraient à l'avenir être considérées comme de bons marqueurs d'éligibilité au rt-PA, permettant de stratifier les patients et de distinguer les plus à risque de développer des TH ou des réocclusions, et chez qui la thrombolyse sera déconseillée. D'autre part, rappelons que dans nos conditions de culture cellulaire, le PJ34 a permis de réduire la libération de MPE induite par le rt-PA ; si nous montrons un tel effet en condition d'ischémie, ceci complètera notre vision du rôle vasculoprotecteur du PJ34 et offrira une preuve supplémentaire de l'intérêt de cet inhibiteur de PARP pour le traitement des AVC ischémiques. Les inhibiteurs de PARP qui permettraient, outre leur effet neuroprotecteur manifeste, une protection du lit vasculaire, offriraient un environnement optimal pour une thrombolyse plus sûre et plus efficace.

ANNEXE

Contre-indications à la thrombolyse intraveineuse par le rt-PA (Actilyse®) lors de l'ischémie cérébrale, selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) publiées en mai 2009 (www.has-sante.fr).



Contre-indications de l'altéplase retenues dans l'AMM de l'ACTILYSE®

« Hypersensibilité à la substance active ou à l'un des excipients.

Comme tous les agents thrombolytiques, ACTILYSE® est contre-indiqué dans tous les cas associés à un risque hémorragique élevé :

- trouble hémorragique significatif actuel ou au cours des 6 derniers mois
- diathèse hémorragique connue
- traitement concomitant par des anticoagulants oraux (par exemple warfarine)
- hémorragie sévère ou potentiellement dangereuse, manifeste ou récente
- antécédents ou suspicion d'hémorragie intracrânienne
- suspicion d'hémorragie sous-arachnoïdienne ou antécédents d'hémorragie sous-arachnoïdienne liée à un anévrisme
- antécédents de lésion sévère du système nerveux central (par exemple néoplasie, anévrisme, intervention chirurgicale intracrânienne ou intrarachidienne)
- massage cardiaque externe traumatique récent (moins de 10 jours), accouchement, ponction récente d'un vaisseau non accessible à la compression (par exemple, ponction de la veine sous-clavière ou jugulaire)
- hypertension artérielle sévère non contrôlée
- endocardite bactérienne, péricardite
- pancréatite aiguë
- ulcères gastro-intestinaux documentés au cours des 3 derniers mois, varices œsophagiennes, anévrisme artériel, malformations artérielles ou veineuses
- néoplasie majorant le risque hémorragique
- hépatopathie sévère, y compris insuffisance hépatique, cirrhose, hypertension portale (varices œsophagiennes) et hépatite évolutive
- intervention chirurgicale ou traumatismes importants au cours des 3 derniers mois.

Dans l'indication d'accident vasculaire cérébral ischémique à la phase aiguë les contre-indications complémentaires sont :

- symptômes d'accident vasculaire cérébral ischémique apparus plus de 3 heures avant l'initiation du traitement ou dont l'heure d'apparition est inconnue
- déficit neurologique mineur ou symptômes s'améliorant rapidement avant l'initiation du traitement
- accident vasculaire cérébral jugé sévère cliniquement (par exemple NIHSS > 25) et/ou par imagerie
- crise convulsive au début de l'accident vasculaire cérébral
- signes d'hémorragie intracrânienne (HIC) au scanner
- symptômes suggérant une hémorragie sous-arachnoïdienne, même en l'absence d'anomalie au scanner
- administration d'héparine au cours des 48 heures précédentes avec un temps de thromboplastine dépassant la limite supérieure de la normale
- patient diabétique présentant des antécédents d'accident vasculaire cérébral
- antécédent d'accident vasculaire cérébral au cours des 3 derniers mois
- plaquettes inférieures à 100 000/mm³
- pression artérielle systolique > 185 mmHg ou pression artérielle diastolique > 110 mmHg, ou traitement d'attaque (par voie intraveineuse) nécessaire pour réduire la pression artérielle à ces valeurs seuils
- glycémie inférieure à 50 ou supérieure à 400 mg/dl.

Utilisation chez l'enfant, l'adolescent et le patient âgé

ACTILYSE® n'est pas indiqué pour le traitement de l'accident vasculaire cérébral à la phase aiguë chez les patients de moins de 18 ans ou de plus de 80 ans. »¹

¹ La plupart des patients inclus dans les essais contrôlés randomisés étaient âgés de 18 à 80 ans.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Monem, H., Dasgupta, S.K., Le, A., Prakasam, A., Thiagarajan, P., 2010. Phagocytosis of platelet microvesicles and beta2- glycoprotein I. *Thrombosis and Haemostasis* 104, 335–341.
- Abu Fanne, R., Nassar, T., Yarovoi, S., Rayan, A., Lamensdorf, I., Karakoveski, M., Vadim, P., Jammal, M., Cines, D.B., Higazi, A.A.-R., 2010. Blood-brain barrier permeability and tPA-mediated neurotoxicity. *Neuropharmacology* 58, 972–980.
- Acheampong, P., Ford, G.A., 2012. Pharmacokinetics of alteplase in the treatment of ischaemic stroke. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 8, 271–281.
- Adams, H.P., Bendixen, B.H., Kappelle, L.J., Biller, J., Love, B.B., Gordon, D.L., Marsh, E.E., 1993. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 24, 35–41.
- Alano, C.C., Kauppinen, T.M., Valls, A.V., Swanson, R.A., 2006. Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9685–9690.
- Alexandrov, A.V., Burgin, W.S., Demchuk, A.M., El-Mitwalli, A., Grotta, J.C., 2001. Speed of intracranial clot lysis with intravenous tissue plasminogen activator therapy: sonographic classification and short-term improvement. *Circulation* 103, 2897–2902.
- Alexandrov, A.V., Grotta, J.C., 2002. Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Neurology* 59, 862–867.
- Alexy, T., Toth, A., Marton, Z., Horvath, B., Koltai, K., Feher, G., Kesmarky, G., Kalai, T., Hideg, K., Sumegi, B., Toth, K., 2004. Inhibition of ADP-evoked platelet aggregation by selected poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 43, 423–431.
- Al Faraj, A., Gazeau, F., Wilhelm, C., Devue, C., Guérin, C.L., Péchoux, C., Paradis, V., Clément, O., Boulanger, C.M., Rautou, P.-E., 2012. Endothelial cell-derived microparticles loaded with iron oxide nanoparticles: feasibility of MR imaging monitoring in mice. *Radiology* 263, 169–178.
- Amabile, N., Guérin, A.P., Leroyer, A., Mallat, Z., Nguyen, C., Boddaert, J., London, G.M., Tedgui, A., Boulanger, C.M., 2005. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 16, 3381–3388.
- Amé, J.-C., Spenlehauer, C., de Murcia, G., 2004. The PARP superfamily. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 26, 882–893.
- Ames, A., Wright, R.L., Kowada, M., Thurston, J.M., Majno, G., 1968. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *The American Journal of Pathology* 52, 437–453.
- Andrabi, S.A., Umanah, G.K.E., Chang, C., Stevens, D.A., Karuppagounder, S.S., Gagné, J.-P., Poirier, G.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2014. Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 10209–10214.
- Angelot, F., Seillès, E., Biichlé, S., Berda, Y., Gaugler, B., Plumas, J., Chaperot, L., Dignat-George, F., Tiberghien, P., Saas, P., Garnache-Ottou, F., 2009. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica* 94, 1502–1512.
- Anglés-Cano, E., Vivien, D., STROKAVERNIR, 2009. [Cellular microparticles, potential useful biomarkers in the identification of cerebrovascular accidents]. *Médecine Sciences: M/S* 25, 843–846.
- An, H., Ford, A.L., Vo, K., Eldeniz, C., Ponisio, R., Zhu, H., Li, Y., Chen, Y., Powers, W.J., Lee, J.-M., Lin, W., 2011. Early changes of tissue perfusion after tissue plasminogen activator in hyperacute ischemic stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 42, 65–72.
- Ansar, S., Chatzikonstantinou, E., Thiagarajah, R., Tritschler, L., Fatar, M., Hennerici, M.G., Meairs, S., 2014a. Pro-inflammatory mediators and apoptosis correlate to rt-PA response in a novel mouse model of thromboembolic stroke. *PloS One* 9, e85849.
- Ansar, S., Chatzikonstantinou, E., Wistuba-Schier, A., Mirau-Weber, S., Fatar, M., Hennerici, M.G., Meairs, S., 2014b. Characterization of a new model of thromboembolic stroke in C57 black/6J mice. *Translational Stroke Research* 5, 526–533.
- Antolín, A.A., Jalencas, X., Yélamos, J., Mestres, J., 2012. Identification of pim kinases as novel targets for PJ34 with confounding effects in PARP biology. *ACS chemical biology* 7, 1962–1967.
- Aredia, F., Scovassi, A.I., 2014. Poly(ADP-ribose): A signaling molecule in different paradigms of cell death. *Biochemical Pharmacology*.

- Armstead, W.M., Riley, J., Kiessling, J.W., Cines, D.B., Higazi, A.A.-R., 2010. Novel plasminogen activator inhibitor-1-derived peptide protects against impairment of cerebrovasodilation after photothrombosis through inhibition of JNK MAPK. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299, R480–485.
- Azevedo, L.C.P., Pedro, M.A., Laurindo, F.R.M., 2007. Circulating microparticles as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery* 2, 41–51.
- Bai, P., Virág, L., 2012. Role of poly(ADP-ribose) polymerases in the regulation of inflammatory processes. *FEBS letters* 586, 3771–3777.
- Balami, J.S., Sutherland, B.A., Buchan, A.M., 2013. Complications associated with recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute ischaemic stroke. *CNS & neurological disorders drug targets* 12, 155–169.
- Balducci, E., Cointe, S., Lacroix, R., Sabatier, F., Dignat-George, F., 2012. Microparticules circulantes, acteurs et marqueurs émergents en pathologie humaine. *Revue Francophone des Laboratoires*, Hémostase 2012, 29–38.
- Barone, F.C., Irving, E.A., Ray, A.M., Lee, J.C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A.M., Legos, J.J., Erhardt, J.A., Ohlstein, E.H., Hunter, A.J., Harrison, D.C., Philpott, K., Smith, B.R., Adams, J.L., Parsons, A.A., 2001. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia. *Medicinal Research Reviews* 21, 129–145.
- Barry, O.P., Pratico, D., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A., 1997. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *The Journal of Clinical Investigation* 99, 2118–2127.
- Beard, R.S., Reynolds, J.J., Bearden, S.E., 2011. Hyperhomocysteinemia increases permeability of the blood-brain barrier by NMDA receptor-dependent regulation of adherens and tight junctions. *Blood* 118, 2007–2014.
- Beard, R.S., Reynolds, J.J., Bearden, S.E., 2012. Metabotropic glutamate receptor 5 mediates phosphorylation of vascular endothelial cadherin and nuclear localization of β -catenin in response to homocysteine. *Vascular Pharmacology* 56, 159–167.
- Béjot, Y., Touzé, E., Jacquin, A., Giroud, M., Mas, J.-L., 2009. [Epidemiology of stroke]. *Médecine Sciences: M/S* 25, 727–732.
- Benarroch, E.E., 2007. Tissue plasminogen activator: beyond thrombolysis. *Neurology* 69, 799–802.
- Benchenane, K., Berezowski, V., Ali, C., Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J.P., Brillault, J., Chuquet, J., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T., Bu, G., Cecchelli, R., Touzani, O., Vivien, D., 2005a. Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* 111, 2241–2249.
- Benchenane, K., Berezowski, V., Fernández-Monreal, M., Brillault, J., Valable, S., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., Vivien, D., Touzani, O., Ali, C., 2005b. Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain barrier from an LRP-dependent to an increased LRP-independent process. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 36, 1065–1070.
- Benkő, R., Pacher, P., Vaslin, A., Kollai, M., Szabó, C., 2004. Restoration of the endothelial function in the aortic rings of apolipoprotein E deficient mice by pharmacological inhibition of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase. *Life Sciences* 75, 1255–1261.
- Berger, C., Fiorelli, M., Steiner, T., Schäbitz, W.R., Bozzao, L., Bluhmki, E., Hacke, W., von Kummer, R., 2001. Hemorrhagic transformation of ischemic brain tissue: asymptomatic or symptomatic? *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 32, 1330–1335.
- Berger, N.A., 1985. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiation Research* 101, 4–15.
- Bergman, D., 2011. Preventing recurrent cerebrovascular events in patients with stroke or transient ischemic attack: the current data. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners* 23, 659–666.
- Betzen, C., White, R., Zehendner, C.M., Pietrowski, E., Bender, B., Luhmann, H.J., Kuhlmann, C.R.W., 2009. Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium. *Free Radical Biology & Medicine* 47, 1212–1220.
- Bianco, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E., Saglietti, L., Schuchman, E.H., Furlan, R., Clementi, E., Matteoli, M., Verderio, C., 2009. Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *The EMBO journal* 28, 1043–1054.
- Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Möller, T., Matteoli, M., Verderio, C., 2005. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174, 7268–7277.
- Bitsch, A., Klene, W., Murtada, L., Prange, H., Rieckmann, P., 1998. A longitudinal prospective study of soluble adhesion molecules in acute stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 29, 2129–2135.

- Blann, A., Kumar, P., Krupinski, J., McCollum, C., Beevers, D.G., Lip, G.Y., 1999. Soluble intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in stroke. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 10, 277–284.
- Bloom, A.L., 1962. The release of thrombin from fibrin by fibrinolysin. *British Journal of Haematology* 8, 129–133.
- Blum, A., Khazim, K., Merei, M., Peleg, A., Blum, N., Vaispapir, V., 2006. The stroke trial - can we predict clinical outcome of patients with ischemic stroke by measuring soluble cell adhesion molecules (CAM)? *European Cytokine Network* 17, 295–298.
- Bogousslavsky, J., Van Melle, G., Regli, F., 1988. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 19, 1083–1092.
- Bonnaud, I., Giraudeau, B., Julié, V., Soulat, L., Beaufils, J.-M., Brock, T., Goralski, M., Perrotin, D., les médecins référents membres du GEUC, 2005. [Epidemiology and management of stroke patients in emergency departments of the Centre region of France]. *Revue Neurologique* 161, 311–317.
- Borgiani, B., Colombo, E., Verderio, claudia, Furlan, R., 2012. Microvesicles: novel biomarkers for neurological disorders. *Membrane Physiology and Membrane Biophysics* 3, 63.
- Bouchama, A., Kunzelmann, C., Dehbi, M., Kwaasi, A., Eldali, A., Zobairi, F., Freyssinet, J.-M., de Prost, D., 2008. Recombinant activated protein C attenuates endothelial injury and inhibits procoagulant microparticles release in baboon heatstroke. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28, 1318–1325.
- Boulanger, C.-M., Leroyer, A.-S., Amabile, N., Tedgui, A., 2008. [Circulating endothelial microparticles: a new marker of vascular injury]. *Annales De Cardiologie Et D'angéiologie* 57, 149–154.
- Boulanger, C.M., Scoazec, A., Ebrahimian, T., Henry, P., Mathieu, E., Tedgui, A., Mallat, Z., 2001. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 104, 2649–2652.
- Bowes, M.P., Zivin, J.A., Rothlein, R., 1993. Monoclonal antibody to the ICAM-1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model. *Experimental Neurology* 119, 215–219.
- Brodsky, S.V., Malinowski, K., Golightly, M., Jesty, J., Goligorsky, M.S., 2002. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation* 106, 2372–2378.
- Brodsky, S.V., Zhang, F., Nasjletti, A., Goligorsky, M.S., 2004. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 286, H1910–1915.
- Brouns, R., De Deyn, P.P., 2009. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 111, 483–495.
- Brown, R.C., Morris, A.P., O'Neil, R.G., 2007. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Research* 1130, 17–30.
- Budaj, M., Poljak, Z., Ďuriš, I., Kaško, M., Imrich, R., Kopáni, M., Maruščáková, L., Hulín, I., 2012. Microparticles: a component of various diseases. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 122 Suppl 1, 24–29.
- Bu, G., Warshawsky, I., Schwartz, A.L., 1994. Cellular receptors for the plasminogen activators. *Blood* 83, 3427–3436.
- Burger, D., Montezano, A.C., Nishigaki, N., He, Y., Carter, A., Touyz, R.M., 2011. Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/ Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31, 1898–1907.
- Burggraf, D., Martens, H.K., Dichgans, M., Hamann, G.F., 2007. Matrix metalloproteinase (MMP) induction and inhibition at different doses of recombinant tissue plasminogen activator following experimental stroke. *Thrombosis and Haemostasis* 98, 963–969.
- Burgin, W.S., Alexandrov, A.V., 2001. Deterioration following improvement with tPA therapy: carotid thrombosis and reocclusion. *Neurology* 56, 568–570.
- Busch, E., Krüger, K., Allegrini, P.R., Kerskens, C.M., Gyngell, M.L., Hoehn-Berlage, M., Hossmann, K.A., 1998. Reperfusion after thrombolytic therapy of embolic stroke in the rat: magnetic resonance and biochemical imaging. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18, 407–418.
- Campbell, D.J., Woodward, M., Chalmers, J.P., Colman, S.A., Jenkins, A.J., Kemp, B.E., Neal, B.C., Patel, A., MacMahon, S.W., 2006. Soluble vascular cell adhesion molecule 1 and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in predicting ischemic stroke in patients with cerebrovascular disease. *Archives of Neurology* 63, 60–65.

- Castillo, J., Alvarez-Sabín, J., Martínez-Vila, E., Montaner, J., Sobrino, T., Vivancos, J., MITICO Study Investigators, 2009. Inflammation markers and prediction of post-stroke vascular disease recurrence: the MITICO study. *Journal of Neurology* 256, 217–224.
- Chen, H., Song, Y.S., Chan, P.H., 2009. Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29, 1262–1272.
- Chen, J., Chen, S., Chen, Y., Zhang, C., Wang, J., Zhang, W., Liu, G., Zhao, B., Chen, Y., 2011. Circulating endothelial progenitor cells and cellular membrane microparticles in db/db diabetic mouse: possible implications in cerebral ischemic damage. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 301, E62–71.
- Chen, Y., Won, S.J., Xu, Y., Swanson, R.A., 2014. Targeting microglial activation in stroke therapy: pharmacological tools and gender effects. *Current Medicinal Chemistry* 21, 2146–2155.
- Cherian, P., Hankey, G.J., Eikelboom, J.W., Thom, J., Baker, R.I., McQuillan, A., Staton, J., Yi, Q., 2003. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 34, 2132–2137.
- Chiarugi, A., 2002a. Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 suppress transcriptional activation in lymphocytes and ameliorate autoimmune encephalomyelitis in rats. *British Journal of Pharmacology* 137, 761–770.
- Chiarugi, A., 2002b. Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The “suicide hypothesis” revisited. *Trends in Pharmacological Sciences* 23, 122–129.
- Chiarugi, A., Moskowitz, M.A., 2003. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *Journal of Neurochemistry* 85, 306–317.
- Chopp, M., Li, Y., Jiang, N., Zhang, R.L., Probst, J., 1996. Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 16, 578–584.
- Chou, J., Mackman, N., Merrill-Skoloff, G., Pedersen, B., Furie, B.C., Furie, B., 2004. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 104, 3190–3197.
- Christou, I., Alexandrov, A.V., Burgin, W.S., Wojner, A.W., Felberg, R.A., Malkoff, M., Grotta, J.C., 2000. Timing of recanalization after tissue plasminogen activator therapy determined by transcranial doppler correlates with clinical recovery from ischemic stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 31, 1812–1816.
- Cipolla, M.J., Lessov, N., Clark, W.M., Haley, E.C., 2000. Postischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 31, 940–945.
- Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., Kalal, A., Geistrikh, I., Klein, R., Bendetz-Nezer, S., Yao, Z., Seger, R., 2007. DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Molecular Cell* 25, 297–308.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M.F., 2001. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology* 3, 339–345.
- Colombo, E., Borgiani, B., Verderio, C., Furlan, R., 2012. Microvesicles: novel biomarkers for neurological disorders. *Frontiers in Physiology* 3, 63.
- Combes, V., Simon, A.C., Grau, G.E., Arnoux, D., Camoin, L., Sabatier, F., Mutin, M., Sanmarco, M., Sampol, J., Dignat-George, F., 1999. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *The Journal of Clinical Investigation* 104, 93–102.
- Connolly, E.S., Winfree, C.J., Prestigiacomo, C.J., Kim, S.C., Choudhri, T.F., Hoh, B.L., Naka, Y., Solomon, R.A., Pinsky, D.J., 1997. Exacerbation of cerebral injury in mice that express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. *Circulation Research* 81, 304–310.
- Connolly, E.S., Winfree, C.J., Springer, T.A., Naka, Y., Liao, H., Yan, S.D., Stern, D.M., Solomon, R.A., Gutierrez-Ramos, J.C., Pinsky, D.J., 1996a. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *The Journal of Clinical Investigation* 97, 209–216.
- Connolly, E.S., Winfree, C.J., Stern, D.M., Solomon, R.A., Pinsky, D.J., 1996b. Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 38,

- 523–531; discussion 532.
- Corrêa, S.A.L., Eales, K.L., 2012. The Role of p38 MAPK and Its Substrates in Neuronal Plasticity and Neurodegenerative Disease. *Journal of Signal Transduction* 2012, 649079.
- Couturier, J.Y., Ding-Zhou, L., Croci, N., Plotkine, M., Margaille, I., 2003. 3-Aminobenzamide reduces brain infarction and neutrophil infiltration after transient focal cerebral ischemia in mice. *Experimental Neurology* 184, 973–980.
- Crome, O., Doeppner, T.R., Schwarting, S., Müller, B., Bähr, M., Weise, J., 2007. Enhanced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation contributes to recombinant tissue plasminogen activator-induced aggravation of ischemic brain injury in vivo. *Journal of neuroscience research* 85, 1734–1743.
- Cronin, C.A., 2010. Intravenous tissue plasminogen activator for stroke: a review of the ECASS III results in relation to prior clinical trials. *The Journal of Emergency Medicine* 38, 99–105.
- Crowell, R.M., Olsson, Y., 1972. Impaired microvascular filling after focal cerebral ischemia in monkeys. *Journal of Neurosurgery* 36, 303–309.
- Cuadrado, E., Ortega, L., Hernández-Guillamon, M., Penalba, A., Fernández-Cadenas, I., Rosell, A., Montaner, J., 2008. Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *Journal of Leukocyte Biology* 84, 207–214.
- Cuadrado, E., Rosell, A., Penalba, A., Slevin, M., Alvarez-Sabín, J., Ortega-Aznar, A., Montaner, J., 2009. Vascular MMP-9/TIMP-2 and neuronal MMP-10 up-regulation in human brain after stroke: a combined laser microdissection and protein array study. *Journal of Proteome Research* 8, 3191–3197.
- Curtin, N.J., Szabo, C., 2013. Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 1217–1256.
- Curtis, A.M., Wilkinson, P.F., Gui, M., Gales, T.L., Hu, E., Edelberg, J.M., 2009. p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 7, 701–709.
- Dalkara, T., Arsava, E.M., 2012. Can restoring incomplete microcirculatory reperfusion improve stroke outcome after thrombolysis? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32, 2091–2099.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G.G., 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical Journal* 342 (Pt 2), 249–268.
- Dantzer, F., Noel, G., Schreiber, V., 2011. [PARP inhibitors: significant progress in cancer therapy]. *Bulletin Du Cancer* 98, 277–290.
- Dasgupta, S.K., Abdel-Monem, H., Niravath, P., Le, A., Bellera, R.V., Langlois, K., Nagata, S., Rumbaut, R.E., Thiagarajan, P., 2009. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 113, 1332–1339.
- Dasgupta, S.K., Le, A., Chavakis, T., Rumbaut, R.E., Thiagarajan, P., 2012. Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation* 125, 1664–1672.
- Del Zoppo, G.J., 1994. Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews* 6, 47–96.
- Del Zoppo, G.J., 1997. Microvascular responses to cerebral ischemia/inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 823, 132–147.
- Del Zoppo, G.J., 2008. Virchow's triad: the vascular basis of cerebral injury. *Reviews in Neurological Diseases* 5 Suppl 1, S12–21.
- Del Zoppo, G.J., Schmid-Schönbein, G.W., Mori, E., Copeland, B.R., Chang, C.M., 1991. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 22, 1276–1283.
- De Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., Walztinger, C., Chambon, P., de Murcia, G., 1997. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7303–7307.
- Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Calogero, R., Lo Iacono, M., Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., Bussolati, B., Camussi, G., 2007. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 110, 2440–2448.
- De Silva, D.A., Fink, J.N., Christensen, S., Ebinger, M., Bladin, C., Levi, C.R., Parsons, M., Butcher, K., Barber, P.A., Donnan, G.A., Davis, S.M., Echoplanar Imaging Thrombolytic Evaluation Trial (EPITHET) Investigators, 2009. Assessing reperfusion and recanalization as markers of clinical outcomes after intravenous thrombolysis in the echoplanar imaging thrombolytic evaluation trial (EPITHET). *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 40, 2872–2874.

- Dignat-George, F., Boulanger, C.M., 2011. The many faces of endothelial microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31, 27–33.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences* 22, 391–397.
- Doeuvre, L., Plawinski, L., Toti, F., Anglés-Cano, E., 2009. Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience. *Journal of Neurochemistry* 110, 457–468.
- Dong, X.-Q., Huang, M., Hu, Y.-Y., Yu, W.-H., Zhang, Z.-Y., 2011. Time course of plasma microparticle concentrations after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Acta Neurologica Scandinavica* 123, 280–288.
- Duan, P., Ni, C., 2014. t-PA stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/p38 signaling pathways. *Die Pharmazie* 69, 70–75.
- Ducrocq, S., Benjelloun, N., Plotkine, M., Ben-Ari, Y., Charriaut-Marlangue, C., 2000. Poly(ADP-ribose) synthase inhibition reduces ischemic injury and inflammation in neonatal rat brain. *Journal of Neurochemistry* 74, 2504–2511.
- Du, L., Zhang, X., Han, Y.Y., Burke, N.A., Kochanek, P.M., Watkins, S.C., Graham, S.H., Carcillo, J.A., Szabó, C., Clark, R.S.B., 2003. Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 18426–18433.
- Durand, A., Chauveau, F., Cho, T.-H., Bolbos, R., Langlois, J.-B., Hermitte, L., Wiart, M., Berthezène, Y., Nighoghossian, N., 2012. Spontaneous reperfusion after in situ thromboembolic stroke in mice. *PLoS One* 7, e50083.
- Durukan, A., Tatlisumak, T., 2007. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 87, 179–197.
- Egi, Y., Matsuura, S., Maruyama, T., Fujio, M., Yuki, S., Akira, T., 2011. Neuroprotective effects of a novel water-soluble poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, MP-124, in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. *Brain Research* 1389, 169–176.
- Ehrensperger, E., Minuk, J., Durcan, L., Mackey, A., Wolfson, C., Fontaine, A.-M., Côté, R., 2005. Predictive value of soluble intercellular adhesion molecule-1 for risk of ischemic events in individuals with cerebrovascular disease. *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)* 20, 456–462.
- El Amki, M., 2013. Thèse de Doctorat Université Paris Descartes. Rôle de la poly(ADP-ribose) polymérase dans les transformations hémorragiques induites par le rt-PA après une ischémie cérébrale.
- El Amki, M., Lerouet, D., Coqueran, B., Curis, E., Orset, C., Vivien, D., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., Margai, I., 2012. Experimental modeling of recombinant tissue plasminogen activator effects after ischemic stroke. *Experimental neurology* 238, 138–144.
- El-Asaad, F., Wheway, J., Hunt, N.H., Grau, G.E.R., Combes, V., 2014. Production, fate and pathogenicity of plasma microparticles in murine cerebral malaria. *PLoS pathogens* 10, e1003839.
- Eliasson, M.J., Sampei, K., Mandir, A.S., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z.Q., Dawson, T.M., Snyder, S.H., Dawson, V.L., 1997. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature Medicine* 3, 1089–1095.
- Elijovich, L., Chong, J.Y., 2010. Current and future use of intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke. *Current Atherosclerosis Reports* 12, 316–321.
- Endemann, D.H., Schiffrin, E.L., 2004. Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 15, 1983–1992.
- Endres, M., Wang, Z.Q., Namura, S., Waeber, C., Moskowitz, M.A., 1997. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17, 1143–1151.
- Erdélyi, K., Bakondi, E., Gergely, P., Szabó, C., Virág, L., 2005. Pathophysiologic role of oxidative stress-induced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation: focus on cell death and transcriptional regulation. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 62, 751–759.
- Falati, S., Liu, Q., Gross, P., Merrill-Skoloff, G., Chou, J., Vandendries, E., Celi, A., Croce, K., Furie, B.C., Furie, B., 2003. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *The Journal of Experimental Medicine* 197, 1585–1598.
- Falvo, M.R., Gorkun, O.V., Lord, S.T., 2010. The molecular origins of the mechanical properties of fibrin. *Biophysical Chemistry* 152, 15–20.
- Fassbender, K., Dempfle, C.E., Mielke, O., Schwartz, A., Daffertshofer, M., Eschenfelder, C., Dollman, M., Hennerici, M., 1999. Changes in coagulation and fibrinolysis markers in acute ischemic stroke treated

- with recombinant tissue plasminogen activator. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 30, 2101–2104.
- Fatokun, A.A., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2014. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *British Journal of Pharmacology* 171, 2000–2016.
- Fiorelli, M., Bastianello, S., von Kummer, R., del Zoppo, G.J., Larrue, V., Lesaffre, E., Ringleb, A.P., Lorenzano, S., Manelfe, C., Bozzao, L., 1999. Hemorrhagic transformation within 36 hours of a cerebral infarct: relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European Cooperative Acute Stroke Study I (ECASS I) cohort. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 30, 2280–2284.
- Franke, C., Brinker, G., Pillekamp, F., Hoehn, M., 2000. Probability of metabolic tissue recovery after thrombolytic treatment of experimental stroke: a magnetic resonance spectroscopic imaging study in rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20, 583–591.
- Fréchou, M., Beray-Berthet, V., Raynaud, J.-S., Mériaux, S., Gombert, F., Lancelot, E., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., Ballet, S., Robert, P., Louin, G., Margaille, I., 2013. Detection of vascular cell adhesion molecule-1 expression with USPIO-enhanced molecular MRI in a mouse model of cerebral ischemia. *Contrast Media & Molecular Imaging* 8, 157–164.
- Frijns, C.J.M., Kappelle, L.J., 2002. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 33, 2115–2122.
- Fujii, S., Lucore, C.L., Hopkins, W.E., Billadello, J.J., Sobel, B.E., 1990. Induction of synthesis of plasminogen activator inhibitor type-1 by tissue-type plasminogen activator in human hepatic and endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis* 64, 412–419.
- Garcia Soriano F, null, Virág, L., Jagtap, P., Szabó, E., Mabley, J.G., Liaudet, L., Marton, A., Hoyt, D.G., Murthy, K.G., Salzman, A.L., Southan, G.J., Szabó, C., 2001. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Medicine* 7, 108–113.
- García-Yébenes, I., Sobrado, M., Zarruk, J.G., Castellanos, M., Pérez de la Ossa, N., Dávalos, A., Serena, J., Lizasoain, I., Moro, M.A., 2011. A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed tissue plasminogen activator administration after in situ thromboembolic stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 42, 196–203.
- Gauberti, M., Martinez de Lizarrondo, S., Orset, C., Vivien, D., 2014. Lack of secondary microthrombosis after thrombin-induced stroke in mice and non-human primates. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 12, 409–414.
- Gauberti, M., Montagne, A., Marcos-Contreras, O.A., Le Béhot, A., Maubert, E., Vivien, D., 2013. Ultra-sensitive molecular MRI of vascular cell adhesion molecule-1 reveals a dynamic inflammatory penumbra after strokes. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 44, 1988–1996.
- Giansanti, V., Donà, F., Tillhon, M., Scovassi, A.I., 2010. PARP inhibitors: new tools to protect from inflammation. *Biochemical pharmacology* 80, 1869–1877.
- Gibson, B.A., Kraus, W.L., 2012. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13, 411–424.
- Gielen, M., 2010. Molecular operation of ionotropic glutamate receptors: proteins that mediate the excitatory synaptic neurotransmission. *Medecine/Sciences* 26, 65-72.
- Godfrey, K.R., Tanswell, P., Bates, R.A., Chappell, M.J., Madden, F.N., 1998. Nonlinear pharmacokinetics of tissue-type plasminogen activator in three animal species: a comparison of mathematical models. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 19, 131–140.
- Gomez-Beldarrain, M., Telleria, M., Garcia-Monco, J.C., 2006. Peripheral arterial embolism during thrombolysis for stroke. *Neurology* 67, 1096–1097.
- Goto, S., Xue, R., Sugo, N., Sawada, M., Blizzard, K.K., Poitras, M.F., Johns, D.C., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Crain, B.J., Traystman, R.J., Mori, S., Hurn, P.D., 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase impairs early and long-term experimental stroke recovery. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 33, 1101–1106.
- Gourdin, M.J., Bree, B., De Kock, M., 2009. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *European Journal of Anaesthesiology* 26, 537–547.
- György, B., Szabó, T.G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A., Buzás, E.I., 2011. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 68, 2667–2688.
- Hacke, W., Donnan, G., Fieschi, C., Kaste, M., von Kummer, R., Broderick, J.P., Brott, T., Frankel, M., Grotta, J.C., Haley, E.C., Kwiatkowski, T., Levine, S.R., Lewandowski, C., Lu, M., Lyden, P., Marler, J.R., Patel, S., Tilley, B.C., Albers, G., Bluhmki, E., Wilhelm, M., Hamilton, S., ATLANTIS Trials Investigators, ECASS Trials Investigators, NINDS rt-PA Study Group Investigators, 2004. Association of outcome with early

- stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* 363, 768–774.
- Haddad, M., Beray-Berthat, V., Coqueran, B., Palmier, B., Szabo, C., Plotkine, M., Margail, I., 2008. Reduction of hemorrhagic transformation by PJ34, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, after permanent focal cerebral ischemia in mice. *European journal of pharmacology* 588, 52–57.
- Haddad, M., Beray-Berthat, V., Coqueran, B., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., Margail, I., 2013. Combined therapy with PJ34, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, reduces tissue plasminogen activator-induced hemorrhagic transformations in cerebral ischemia in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 27, 393–401.
- Haddad, M., Rhinn, H., Bloquel, C., Coqueran, B., Szabó, C., Plotkine, M., Scherman, D., Margail, I., 2006. Anti-inflammatory effects of PJ34, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, in transient focal cerebral ischemia in mice. *British Journal of Pharmacology* 149, 23–30.
- Haelewyn, B., Risso, J.-J., Abraini, J.H., 2010. Human recombinant tissue-plasminogen activator (alteplase): why not use the “human” dose for stroke studies in rats? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30, 900–903.
- Hagood, J.S., Olman, M.A., Godoy, J.A., Rivera, K.E., Fuller, G.M., 1996. Regulation of type I plasminogen activator inhibitor by fibrin degradation products in rat lung fibroblasts. *Blood* 87, 3749–3757.
- Ha, H.C., 2004. Defective transcription factor activation for proinflammatory gene expression in poly(ADP-ribose) polymerase 1-deficient glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5087–5092.
- Ha, H.C., Hester, L.D., Snyder, S.H., 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3270–3275.
- Hamby, A.M., Suh, S.W., Kauppinen, T.M., Swanson, R.A., 2007. Use of a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor to suppress inflammation and neuronal death after cerebral ischemia-reperfusion. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 38, 632–636.
- Hase, Y., Okamoto, Y., Fujita, Y., Kitamura, A., Nakabayashi, H., Ito, H., Maki, T., Washida, K., Takahashi, R., Ihara, M., 2012. Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, prevents no-reflow and hemorrhage in mice with focal cerebral ischemia. *Experimental Neurology* 233, 523–533.
- Hassa, P.O., Covic, M., Hasan, S., Imhof, R., Hottiger, M.O., 2001. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 45588–45597.
- Hassa, P.O., Haenni, S.S., Buerki, C., Meier, N.I., Lane, W.S., Owen, H., Gersbach, M., Imhof, R., Hottiger, M.O., 2005. Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 40450–40464.
- Hassa, P.O., Hottiger, M.O., 2002. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 59, 1534–1553.
- Hayon, Y., Dashevsky, O., Shai, E., Brill, A., Varon, D., Leker, R.R., 2012. Platelet microparticles induce angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia. *Current Neurovascular Research* 9, 185–192.
- Heeres, J.T., Hergenrother, P.J., 2007. Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Current Opinion in Chemical Biology* 11, 644–653.
- Heiss, W.-D., 2011. The ischemic penumbra: correlates in imaging and implications for treatment of ischemic stroke. The Johann Jacob Wepfer award 2011. *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)* 32, 307–320.
- Herring, J.M., McMichael, M.A., Smith, S.A., 2013. Microparticles in health and disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 27, 1020–1033.
- Heye, N., Cervos-Navarro, J., 1996. Microthromboemboli in acute infarcts: analysis of 40 autopsy cases. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 27, 431–434.
- Horstman, L.L., Ahn, Y.S., 1999. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 30, 111–142.
- Horstman, L.L., Jy, W., Minagar, A., Bidot, C.J., Jimenez, J.J., Alexander, J.S., Ahn, Y.S., 2007. Cell-derived microparticles and exosomes in neuroinflammatory disorders. *International Review of Neurobiology* 79, 227–268.
- Hosseinzadeh, S., Zahmatkesh, M., Zarrindast, M.-R., Hassanzadeh, G.-R., Karimian, M., Sarrafnejad, A., 2013. Elevated CSF and plasma microparticles in a rat model of streptozotocin-induced cognitive impairment. *Behavioural Brain Research* 256, 503–511.

- Huang, J., Choudhri, T.F., Winfree, C.J., McTaggart, R.A., Kiss, S., Mocco, J., Kim, L.J., Protopsaltis, T.S., Zhang, Y., Pinsky, D.J., Connolly, E.S., 2000. Postischemic cerebrovascular E-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 31, 3047–3053.
- Huang, J., Upadhyay, U.M., Tamargo, R.J., 2006. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surgical Neurology* 66, 232–245.
- Huang, M., Hu, Y.-Y., Dong, X.-Q., 2009. High concentrations of procoagulant microparticles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with acute basal ganglia hemorrhage are associated with poor outcome. *Surgical Neurology* 72, 481–489; discussion 489.
- Hugel, B., Martínez, M.C., Kunzelmann, C., Freyssinet, J.-M., 2005. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda, Md.)* 20, 22–27.
- Hu, G., Wu, Z., Yang, F., Zhao, H., Liu, X., Deng, Y., Shi, M., Zhao, G., 2013. Ginsenoside Rd blocks AIF mitochondrio-nuclear translocation and NF- κ B nuclear accumulation by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1 after focal cerebral ischemia in rats. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 34, 2101–2106.
- Ishiguro, M., Mishiro, K., Fujiwara, Y., Chen, H., Izuta, H., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Satoh, M., Iwama, T., Hara, H., 2010. Phosphodiesterase-III inhibitor prevents hemorrhagic transformation induced by focal cerebral ischemia in mice treated with tPA. *PLoS One* 5, e15178.
- Ishrat, T., Soliman, S., Guan, W., Saler, M., Fagan, S.C., 2012. Vascular protection to increase the safety of tissue plasminogen activator for stroke. *Current Pharmaceutical Design* 18, 3677–3684.
- Iwashita, A., Tojo, N., Matsuura, S., Yamazaki, S., Kamijo, K., Ishida, J., Yamamoto, H., Hattori, K., Matsuoka, N., Mutoh, S., 2004. A novel and potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, FR247304 (5-chloro-2-[3-(4-phenyl-3,6-dihydro-1(2H)-pyridinyl)propyl]-4(3H)-quinazolinone), attenuates neuronal damage in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 310, 425–436.
- Jansen, F., Yang, X., Hoyer, F.F., Paul, K., Heiermann, N., Becher, M.U., Abu Hussein, N., Kebschull, M., Bedorf, J., Franklin, B.S., Latz, E., Nickenig, G., Werner, N., 2012. Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin I/phosphatidylserine receptor dependent and prevents apoptosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32, 1925–1935.
- Jeanneteau, J., Hibert, P., Martinez, M.C., Tual-Chalot, S., Tamareille, S., Furber, A., Andriantsitohaina, R., Prunier, F., 2012. Microparticle release in remote ischemic conditioning mechanism. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 303, H871–877.
- Jennewein, C., Tran, N., Paulus, P., Ellinghaus, P., Eble, J.A., Zacharowski, K., 2011. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 17, 568–573.
- Jiang, Q., Zhang, R.L., Zhang, Z.G., Ewing, J.R., Jiang, P., Divine, G.W., Knight, R.A., Chopp, M., 2000. Magnetic resonance imaging indexes of therapeutic efficacy of recombinant tissue plasminogen activator treatment of rat at 1 and 4 hours after embolic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20, 21–27.
- Jickling, G.C., Liu, D., Stamova, B., Ander, B.P., Zhan, X., Lu, A., Sharp, F.R., 2014. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34, 185–199.
- Jimenez, J.J., Jy, W., Mauro, L.M., Soderland, C., Horstman, L.L., Ahn, Y.S., 2003. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thrombosis Research* 109, 175–180.
- Jullienne, A., Montagne, A., Orset, C., Lesept, F., Jane, D.E., Monaghan, D.T., Maubert, E., Vivien, D., Ali, C., 2011. Selective inhibition of GluN2D-containing N-methyl-D-aspartate receptors prevents tissue plasminogen activator-promoted neurotoxicity both in vitro and in vivo. *Molecular Neurodegeneration* 6, 68.
- Jung, K.-H., Chu, K., Lee, S.-T., Park, H.-K., Bahn, J.-J., Kim, D.-H., Kim, J.-H., Kim, M., Kun Lee, S., Roh, J.-K., 2009. Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Annals of Neurology* 66, 191–199.
- Justicia, C., Martín, A., Rojas, S., Gironella, M., Cervera, A., Panés, J., Chamorro, A., Planas, A.M., 2006. Anti-VCAM-1 antibodies did not protect against ischemic damage either in rats or in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26, 421–432.
- Jy, W., Jimenez, J.J., Mauro, L.M., Horstman, L.L., Cheng, P., Ahn, E.R., Bidot, C.J., Ahn, Y.S., 2005. Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin

- dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 3, 1301–1308.
- Kanai, M., Uchida, M., Hanai, S., Uematsu, N., Uchida, K., Miwa, M., 2000. Poly(ADP-ribose) polymerase localizes to the centrosomes and chromosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278, 385–389.
- Kanazawa, M., Igarashi, H., Kawamura, K., Takahashi, T., Kakita, A., Takahashi, H., Nakada, T., Nishizawa, M., Shimohata, T., 2011. Inhibition of VEGF signaling pathway attenuates hemorrhage after tPA treatment. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31, 1461–1474.
- Kassem-Moussa, H., Graffagnino, C., 2002. Nonocclusion and spontaneous recanalization rates in acute ischemic stroke: a review of cerebral angiography studies. *Archives of Neurology* 59, 1870–1873.
- Kaste, M., Skyhoj Olsen, T., Orgogozo, J., Bogousslavsky, J., Hacke, W., 2000. Organization of stroke care: education, stroke units and rehabilitation. European Stroke Initiative (EUSI). *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)* 10 Suppl 3, 1–11.
- Kauppinen, T.M., Chan, W.Y., Suh, S.W., Wiggins, A.K., Huang, E.J., Swanson, R.A., 2006. Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7136–7141.
- Kauppinen, T.M., Suh, S.W., Berman, A.E., Hamby, A.M., Swanson, R.A., 2009. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase suppresses inflammation and promotes recovery after ischemic injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29, 820–829.
- Kauppinen, T.M., Swanson, R.A., 2007. The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. *Neuroscience* 145, 1267–1272.
- Kaur, J., Zhao, Z., Klein, G.M., Lo, E.H., Buchan, A.M., 2004. The neurotoxicity of tissue plasminogen activator? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 24, 945–963.
- Khalessi, A.A., Natarajan, S.K., Orion, D., Binning, M.J., Siddiqui, A., Levy, E.I., Hopkins, L.N., 2011. Acute stroke intervention. *JACC. Cardiovascular interventions* 4, 261–269.
- Khandoga, A., Biberthaler, P., Enders, G., Krombach, F., 2004. 5-Aminoisoquinolinone, a novel inhibitor of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase, reduces microvascular liver injury but not mortality rate after hepatic ischemia-reperfusion. *Critical Care Medicine* 32, 472–477.
- Khandoga, A., Enders, G., Biberthaler, P., Krombach, F., 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase triggers the microvascular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 283, G553–560.
- Khatri, P., Neff, J., Broderick, J.P., Khoury, J.C., Carrozzella, J., Tomsick, T., IMS-I Investigators, 2005. Revascularization end points in stroke interventional trials: recanalization versus reperfusion in IMS-I. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 36, 2400–2403.
- Khatri, P., Wechsler, L.R., Broderick, J.P., 2007. Intracranial hemorrhage associated with revascularization therapies. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 38, 431–440.
- Kiefmann, R., Heckel, K., Schenkat, S., Dörger, M., Wesierska-Gadek, J., Goetz, A.E., 2004. Platelet-endothelial cell interaction in pulmonary micro-circulation: the role of PARS. *Thrombosis and Haemostasis* 91, 761–770.
- Kilic, E., Bähr, M., Hermann, D.M., 2001. Effects of recombinant tissue plasminogen activator after intraluminal thread occlusion in mice: role of hemodynamic alterations. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 32, 2641–2647.
- Kilic, E., Kilic, U., Matter, C.M., Lüscher, T.F., Bassetti, C.L., Hermann, D.M., 2005. Aggravation of focal cerebral ischemia by tissue plasminogen activator is reversed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor but does not depend on endothelial NO synthase. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 36, 332–336.
- Kleine, H., Poreba, E., Lesniewicz, K., Hassa, P.O., Hottiger, M.O., Litchfield, D.W., Shilton, B.H., Lüscher, B., 2008. Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. *Molecular Cell* 32, 57–69.
- Kleinschnitz, C., Stoll, G., Bendszus, M., Schuh, K., Pauer, H.-U., Burfeind, P., Renné, C., Gailani, D., Nieswandt, B., Renné, T., 2006. Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *The Journal of Experimental Medicine* 203, 513–518.
- Koga, H., Sugiyama, S., Kugiyama, K., Watanabe, K., Fukushima, H., Tanaka, T., Sakamoto, T., Yoshimura, M.,

- Jinnouchi, H., Ogawa, H., 2005. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 45, 1622–1630.
- Koh, S.-H., Chang, D.-I., Kim, H.-T., Kim, J., Kim, M.-H., Kim, K.S., Bae, I., Kim, H., Kim, D.W., Kim, S.H., 2005. Effect of 3-aminobenzamide, PARP inhibitor, on matrix metalloproteinase-9 level in plasma and brain of ischemic stroke model. *Toxicology* 214, 131–139.
- Koh, S.-H., Park, Y., Song, C.W., Kim, J.G., Kim, K., Kim, J., Kim, M.-H., Lee, S.R., Kim, D.W., Yu, H.-J., Chang, D.-I., Hwang, S.J., Kim, S.H., 2004. The effect of PARP inhibitor on ischaemic cell death, its related inflammation and survival signals. *The European Journal of Neuroscience* 20, 1461–1472.
- Korninger, C., Collen, D., 1981. Studies on the specific fibrinolytic effect of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in human blood and in various animal species in vitro. *Thrombosis and Haemostasis* 46, 561–565.
- Koudstaal, P.J., Stibbe, J., Vermeulen, M., 1988. Fatal ischaemic brain oedema after early thrombolysis with tissue plasminogen activator in acute stroke. *BMJ (Clinical research ed.)* 297, 1571–1574.
- Kraft, P., Schwarz, T., Göb, E., Heydenreich, N., Brede, M., Meuth, S.G., Kleinschnitz, C., 2013. The phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram protects from ischemic stroke in mice by reducing blood-brain-barrier damage, inflammation and thrombosis. *Experimental Neurology* 247, 80–90.
- Kraus, W.L., 2008. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Current Opinion in Cell Biology* 20, 294–302.
- Kruithof, E.K.O., Dunoyer-Geindre, S., 2014. Human tissue-type plasminogen activator. *Thrombosis and Haemostasis* 112.
- Kumaran, D., Udayabanu, M., Nair, R.U., R, A., Katyal, A., 2008. Benzamide protects delayed neuronal death and behavioural impairment in a mouse model of global cerebral ischemia. *Behavioural Brain Research* 192, 178–184.
- Kunz, A., Dirnagl, U., Mergenthaler, P., 2010. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Practice & Research. Clinical Anaesthesiology* 24, 495–509.
- Kuriyama, N., Nagakane, Y., Hosomi, A., Ohara, T., Kasai, T., Harada, S., Takeda, K., Yamada, K., Ozasa, K., Tokuda, T., Watanabe, Y., Mizuno, T., Nakagawa, M., 2010. Evaluation of factors associated with elevated levels of platelet-derived microparticles in the acute phase of cerebral infarction. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis: Official Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 16, 26–32.
- Lackner, P., Dietmann, A., Beer, R., Fischer, M., Broessner, G., Helbok, R., Marxgut, J., Pfausler, B., Schmutzhard, E., 2010. Cellular microparticles as a marker for cerebral vasospasm in spontaneous subarachnoid hemorrhage. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 41, 2353–2357.
- Lacroix, R., Dignat-George, F., 2012. Microparticles as a circulating source of procoagulant and fibrinolytic activities in the circulation. *Thrombosis Research* 129 Suppl 2, S27–29.
- Lacroix, R., Plawinski, L., Robert, S., Doeuvre, L., Sabatier, F., Martinez de Lizarrondo, S., Mezzapesa, A., Anfosso, F., Leroyer, A.S., Poullin, P., Jourde, N., Njock, M.-S., Boulanger, C.M., Anglés-Cano, E., Dignat-George, F., 2012. Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica* 97, 1864–1872.
- Lai, C.P.-K., Breakefield, X.O., 2012. Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. *Frontiers in Physiology* 3, 228.
- Lai, T.W., Zhang, S., Wang, Y.T., 2014. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology* 115, 157–188.
- Lai, Y., Chen, Y., Watkins, S.C., Nathaniel, P.D., Guo, F., Kochanek, P.M., Jenkins, L.W., Szabó, C., Clark, R.S.B., 2008. Identification of poly-ADP-ribosylated mitochondrial proteins after traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry* 104, 1700–1711.
- Lakhan, S.E., Kirchgessner, A., Hofer, M., 2009. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of Translational Medicine* 7, 97.
- Langhauser, F.L., Heiler, P.M., Grudzinski, S., Lemke, A., Alonso, A., Schad, L.R., Hennerici, M.G., Meairs, S., Fatar, M., 2012. Thromboembolic stroke in C57BL/6 mice monitored by 9.4 T MRI using a 1H cryo probe. *Experimental & Translational Stroke Medicine* 4, 18.
- Latour, L.L., Kang, D.-W., Ezzeddine, M.A., Chalela, J.A., Warach, S., 2004. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Annals of Neurology* 56, 468–477.
- Lechaftois, M., Dreano, E., Palmier, B., Margail, I., Marchand-Leroux, C., Bachelot-Loza, C., Lerouet D., 2014. Another "string to the bow" of PJ34, a potent poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor: an antiplatelet effect through P2Y12 antagonism? *Plos One*. Sous presse.

- Lee, S.K., Yang, S.-H., Kwon, I., Lee, O.-H., Heo, J.H., 2014. Role of tumour necrosis factor receptor-1 and nuclear factor- κ B in production of TNF- α -induced pro-inflammatory microparticles in endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis* 112.
- Lee, S.-T., Chu, K., Jung, K.-H., Kim, J.-M., Moon, H.-J., Bahn, J.-J., Im, W.-S., Sunwoo, J., Moon, J., Kim, M., Lee, S.K., Roh, J.-K., 2012. Circulating CD62E+ microparticles and cardiovascular outcomes. *PLoS One* 7, e35713.
- Lee, Y.J., Jy, W., Horstman, L.L., Janania, J., Reyes, Y., Kelley, R.E., Ahn, Y.S., 1993. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thrombosis Research* 72, 295–304.
- Lenglet, S., Montecucco, F., Denes, A., Coutts, G., Pinteaux, E., Mach, F., Schaller, K., Gasche, Y., Copin, J.-C., 2014a. Recombinant tissue plasminogen activator enhances microglial cell recruitment after stroke in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34, 802–812.
- Lenglet, S., Montecucco, F., Mach, F., Schaller, K., Gasche, Y., Copin, J.-C., 2014b. Analysis of the expression of nine secreted matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in the brain of mice subjected to ischaemic stroke. *Thrombosis and Haemostasis* 112.
- Lenzsér, G., Kis, B., Snipes, J.A., Gáspár, T., Sándor, P., Komjáti, K., Szabó, C., Busija, D.W., 2007. Contribution of poly(ADP-ribose) polymerase to postischemic blood-brain barrier damage in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27, 1318–1326.
- Leroyer, A.S., Anfosso, F., Lacroix, R., Sabatier, F., Simoncini, S., Njock, S.M., Jourde, N., Brunet, P., Camoin-Jau, L., Sampol, J., Dignat-George, F., 2010. Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis* 104, 456–463.
- Leroyer, A.S., Ebrahimian, T.G., Cochain, C., Récalde, A., Blanc-Brude, O., Mees, B., Vilar, J., Tedgui, A., Levy, B.I., Chimini, G., Boulanger, C.M., Silvestre, J.-S., 2009. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* 119, 2808–2817.
- Leroyer, A.S., Isobe, H., Lesèche, G., Castier, Y., Wassef, M., Mallat, Z., Binder, B.R., Tedgui, A., Boulanger, C.M., 2007. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *Journal of the American College of Cardiology* 49, 772–777.
- Levi, M., van der Poll, T., Büller, H.R., 2004. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 109, 2698–2704.
- Leys, D., Béjot, Y., Debette, S., Giroud, M., 2008. Burden of stroke in France. *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society* 3, 117–119.
- Liaudet, L., Szabó, E., Timashpolsky, L., Virág, L., Cziráki, A., Szabó, C., 2001. Suppression of poly (ADP-ribose) polymerase activation by 3-aminobenzamide in a rat model of myocardial infarction: long-term morphological and functional consequences. *British Journal of Pharmacology* 133, 1424–1430.
- Lindley, R.I., Wardlaw, J.M., Sandercock, P.A.G., Rimoldi, P., Lewis, S.C., Signorini, D.F., Ricci, S., 2004. Frequency and risk factors for spontaneous hemorrhagic transformation of cerebral infarction. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association* 13, 235–246.
- Lindsberg, P.J., Carpén, O., Paetau, A., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Kaste, M., 1996. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation* 94, 939–945.
- Little, J.R., Kerr, F.W.L., Sundt, T.M., 1976. Microcirculatory Obstruction in Focal Cerebral Ischemia: An Electron Microscopic Investigation in Monkeys. *Stroke* 7, 25–30.
- Little, J.R., Kerr, F.W., Sundt, T.M., 1975. Microcirculatory obstruction in focal cerebral ischemia. Relationship to neuronal alterations. *Mayo Clinic Proceedings* 50, 264–270.
- Liu, D., Gharavi, R., Pitta, M., Gleichmann, M., Mattson, M.P., 2009. Nicotinamide prevents NAD+ depletion and protects neurons against excitotoxicity and cerebral ischemia: NAD+ consumption by SIRT1 may endanger energetically compromised neurons. *Neuromolecular Medicine* 11, 28–42.
- Li, X., Klaus, J.A., Zhang, J., Xu, Z., Kibler, K.K., Andrabi, S.A., Rao, K., Yang, Z.-J., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Koehler, R.C., 2010. Contributions of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and -2 to nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and injury from focal cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry* 113, 1012–1022.
- Love, S., Barber, R., Wilcock, G.K., 1999. Neuronal accumulation of poly(ADP-ribose) after brain ischaemia. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 25, 98–103.
- Love, S., Barber, R., Wilcock, G.K., 2000. Neuronal death in brain infarcts in man. *Neuropathology and Applied*

- Neurobiology* 26, 55–66.
- Lovren, F., Verma, S., 2013. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clinical Chemistry* 59, 1166–1174.
- Luby, M., Warach, S.J., Nadareishvili, Z., Merino, J.G., 2014. Immediate changes in stroke lesion volumes post thrombolysis predict clinical outcome. *Stroke* 45, 3275–3279.
- Lukasik, M., Rozalski, M., Luzak, B., Michalak, S., Kozubski, W., Watala, C., 2010. Platelet activation and reactivity in the convalescent phase of ischaemic stroke. *Thrombosis and Haemostasis* 103, 644–650.
- Lukic-Panin, V., Deguchi, K., Yamashita, T., Shang, J., Zhang, X., Tian, F., Liu, N., Kawai, H., Matsuura, T., Abe, K., 2010. Free radical scavenger edaravone administration protects against tissue plasminogen activator induced oxidative stress and blood brain barrier damage. *Current Neurovascular Research* 7, 319–329.
- Luo, Y., Yin, W., Signore, A.P., Zhang, F., Hong, Z., Wang, S., Graham, S.H., Chen, J., 2006. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Journal of Neurochemistry* 97, 435–448.
- Macrez, R., Obiang, P., Gauberti, M., Roussel, B., Baron, A., Parcq, J., Cassé, F., Hommet, Y., Orset, C., Agin, V., Bezin, L., Berrocoso, T.G., Petersen, K.U., Montaner, J., Maubert, E., Vivien, D., Ali, C., 2011. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 42, 2315–2322.
- Mahagne, M.-H., 2008. La thrombolyse de l'infarctus cérébral aigu en 2008 : état des lieux et perspectives. *STV. Sang thrombose vaisseaux* 20, 527–533.
- Mallat, Z., Benamer, H., Hugel, B., Benessiano, J., Steg, P.G., Freyssinet, J.M., Tedgui, A., 2000. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101, 841–843.
- Mann, K.G., 2011. Thrombin generation in hemorrhage control and vascular occlusion. *Circulation* 124, 225–235.
- Marder, V.J., Chute, D.J., Starkman, S., Abolian, A.M., Kidwell, C., Liebeskind, D., Ovbiagele, B., Vinuela, F., Duckwiler, G., Jahan, R., Vespa, P.M., Selco, S., Rajajee, V., Kim, D., Sanossian, N., Saver, J.L., 2006. Analysis of thrombi retrieved from cerebral arteries of patients with acute ischemic stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 37, 2086–2093.
- Markiewicz, M., Richard, E., Marks, N., Ludwicka-Bradley, A., 2013. Impact of endothelial microparticles on coagulation, inflammation, and angiogenesis in age-related vascular diseases. *Journal of Aging Research* 2013, 734509.
- Martinet, W., Knaapen, M.W.M., De Meyer, G.R.Y., Herman, A.G., Kockx, M.M., 2002. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 106, 927–932.
- Marzesco, A.-M., Janich, P., Wilsch-Bräuninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., Huttner, W.B., 2005. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *Journal of Cell Science* 118, 2849–2858.
- Massberg, S., Enders, G., Matos, F.C., Tomic, L.I., Leiderer, R., Eisenmenger, S., Messmer, K., Krombach, F., 1999. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 94, 3829–3838.
- Mause, S.F., Weber, C., 2010. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circulation Research* 107, 1047–1057.
- Mayhan, W.G., Amundsen, S.M., Faraci, F.M., Heistad, D.D., 1988. Responses of cerebral arteries after ischemia and reperfusion in cats. *The American Journal of Physiology* 255, H879–884.
- Mehta, S.L., Manhas, N., Raghurir, R., 2007. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Research Reviews* 54, 34–66.
- Meissner, W., Lempert, T., Saeuberlich-Knigge, S., Bocksch, W., Pape, U.-F., 2006. Fatal embolic myocardial infarction after systemic thrombolysis for stroke. *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)* 22, 213–214.
- Ménissier de Murcia, J., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Amé, J.-C., Dierich, A., LeMeur, M., Sabatier, L., Chambon, P., de Murcia, G., 2003. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *The EMBO journal* 22, 2255–2263.
- Mezentsev, A., Merks, R.M.H., O'Riordan, E., Chen, J., Mendeleev, N., Goligorsky, M.S., Brodsky, S.V., 2005. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 289, H1106–1114.

- Micieli, G., Marcheselli, S., Tosi, P.A., 2009. Safety and efficacy of alteplase in the treatment of acute ischemic stroke. *Vascular Health and Risk Management* 5, 397–409.
- Millán, M., Dorado, L., Dávalos, A., 2010. Fibrinolytic therapy in acute stroke. *Current Cardiology Reviews* 6, 218–226.
- Miller, A.A., Budzyn, K., Sobey, C.G., 2010. Vascular dysfunction in cerebrovascular disease: mechanisms and therapeutic intervention. *Clinical Science (London, England: 1979)* 119, 1–17.
- Mirshahi, M., Soria, J., Soria, C., Faivre, R., Lu, H., Courtney, M., Roitsch, C., Tripier, D., Caen, J.P., 1989. Evaluation of the inhibition by heparin and hirudin of coagulation activation during r-tPA-induced thrombolysis. *Blood* 74, 1025–1030.
- Miyazaki, T., Kimura, Y., Ohata, H., Hashimoto, T., Shibata, K., Hasumi, K., Honda, K., 2011. Distinct effects of tissue-type plasminogen activator and SMTP-7 on cerebrovascular inflammation following thrombolytic reperfusion. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 42, 1097–1104.
- Mohan, K.M., Wolfe, C.D.A., Rudd, A.G., Heuschmann, P.U., Kolominsky-Rabas, P.L., Grieve, A.P., 2011. Risk and cumulative risk of stroke recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 42, 1489–1494.
- Molina, C.A., Montaner, J., Arenillas, J.F., Ribo, M., Rubiera, M., Alvarez-Sabín, J., 2004. Differential pattern of tissue plasminogen activator-induced proximal middle cerebral artery recanalization among stroke subtypes. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 35, 486–490.
- Montaner, J., Molina, C.A., Monasterio, J., Abilleira, S., Arenillas, J.F., Ribó, M., Quintana, M., Alvarez-Sabín, J., 2003. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 107, 598–603.
- Montrucchio, G., Lupia, E., De Martino, A., Silvestro, L., Savu, S.R., Cacace, G., De Filippi, P.G., Emanuelli, G., Camussi, G., 1996. Plasmin promotes an endothelium-dependent adhesion of neutrophils. Involvement of platelet activating factor and P-selectin. *Circulation* 93, 2152–2160.
- Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J.-M., Toti, F., 2011. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31, 15–26.
- Moroni, F., 2008. Poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP-1) and postischemic brain damage. *Current Opinion in Pharmacology* 8, 96–103.
- Moroni, F., Chiarugi, A., 2009. Post-ischemic brain damage: targeting PARP-1 within the ischemic neurovascular units as a realistic avenue to stroke treatment. *The FEBS journal* 276, 36–45.
- Morrow, D.A., Brickman, C.M., Murphy, S.A., Baran, K., Krakover, R., Dauerman, H., Kumar, S., Slomowitz, N., Grip, L., McCabe, C.H., Salzman, A.L., 2009. A randomized, placebo-controlled trial to evaluate the tolerability, safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (INO-1001) in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of the TIMI 37 trial. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 27, 359–364.
- Mosesson, M.W., 2005. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 3, 1894–1904.
- Nagayama, T., Simon, R.P., Chen, D., Henshall, D.C., Pei, W., Stetler, R.A., Chen, J., 2000. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in the rat hippocampus may contribute to cellular recovery following sublethal transient global ischemia. *Journal of Neurochemistry* 74, 1636–1645.
- Nakajima, H., Nagaso, H., Kakui, N., Ishikawa, M., Hiranuma, T., Hoshiko, S., 2004. Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 42774–42786.
- Nassar, T., Akkawi, S., Shina, A., Haj-Yehia, A., Bdeir, K., Tarshis, M., Heyman, S.N., Higazi, A.A.-R., 2004. In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone. *Blood* 103, 897–902.
- Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margail, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D., Buisson, A., 2001. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nature Medicine* 7, 59–64.
- Nicolescu, A.C., Holt, A., Kandasamy, A.D., Pacher, P., Schulz, R., 2009. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 by PARP inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 387, 646–650.
- Niessen, F., Hilger, T., Hoehn, M., Hossmann, K.-A., 2002. Thrombolytic treatment of clot embolism in rat: comparison of intra-arterial and intravenous application of recombinant tissue plasminogen activator. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 33, 2999–3005.
- Ninomia, T., Wang, L., Kumar, S.R., Kim, A., Zlokovic, B.V., 2000. Brain injury and cerebrovascular fibrin deposition correlate with reduced antithrombotic brain capillary functions in a hypertensive stroke

- model. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20, 998–1009.
- Nomura, S., Tandon, N.N., Nakamura, T., Cone, J., Fukuhara, S., Kambayashi, J., 2001. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* 158, 277–287.
- Nougier, C., Marijon, A., 2012. Caractéristiques immuno-analytiques des D-dimères. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 27, 83–88.
- Okada, Y., Copeland, B.R., Fitridge, R., Koziol, J.A., del Zoppo, G.J., 1994a. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 25, 1847–1853; discussion 1853–1854.
- Okada, Y., Copeland, B.R., Mori, E., Tung, M.M., Thomas, W.S., del Zoppo, G.J., 1994b. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 25, 202–211.
- Omidi, Y., Campbell, L., Barar, J., Connell, D., Akhtar, S., Gumbleton, M., 2003. Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Research* 990, 95–112.
- Orbe, J., Barrenetxe, J., Rodriguez, J.A., Vivien, D., Orset, C., Parks, W.C., Birkland, T.P., Serrano, R., Purroy, A., Martinez de Lizarrondo, S., Angles-Cano, E., Páramo, J.A., 2011. Matrix metalloproteinase-10 effectively reduces infarct size in experimental stroke by enhancing fibrinolysis via a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-mediated mechanism. *Circulation* 124, 2909–2919.
- Orset, C., Macrez, R., Young, A.R., Panthou, D., Angles-Cano, E., Maubert, E., Agin, V., Vivien, D., 2007. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 38, 2771–2778.
- Oumouna-Benachour, K., Hans, C.P., Suzuki, Y., Naura, A., Datta, R., Belmadani, S., Fallon, K., Woods, C., Boulares, A.H., 2007. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition reduces atherosclerotic plaque size and promotes factors of plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice: effects on macrophage recruitment, nuclear factor-kappaB nuclear translocation, and foam cell death. *Circulation* 115, 2442–2450.
- Pacher, P., Szabó, C., 2005. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 1568–1580.
- Pacher, P., Szabó, C., 2007. Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovascular Drug Reviews* 25, 235–260.
- Paciaroni, M., Caso, V., Agnelli, G., 2009. The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *European Neurology* 61, 321–330.
- Paganelli, F., Alessi, M.C., Morange, P., Maixent, J.M., Lévy, S., Vague, I.J., 1999. Relationship of plasminogen activator inhibitor-1 levels following thrombolytic therapy with rt-PA as compared to streptokinase and patency of infarct related coronary artery. *Thrombosis and Haemostasis* 82, 104–108.
- Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B.C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y.M., Sajer, S.A., Furie, B., 1992. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 359, 848–851.
- Pancioli, A.M., Broderick, J., Kothari, R., Brott, T., Tuchfarber, A., Miller, R., Khoury, J., Jauch, E., 1998. Public perception of stroke warning signs and knowledge of potential risk factors. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 279, 1288–1292.
- Parcq, J., Bertrand, T., Baron, A.F., Hommet, Y., Anglès-Cano, E., Vivien, D., 2013. Molecular requirements for safer generation of thrombolytics by bioengineering the tissue-type plasminogen activator A chain. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 11, 539–546.
- Parcq, J., Bertrand, T., Montagne, A., Baron, A.F., Macrez, R., Billard, J.M., Briens, A., Hommet, Y., Wu, J., Yepes, M., Lijnen, H.R., Dutar, P., Anglès-Cano, E., Vivien, D., 2012. Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death and Differentiation* 19, 1983–1991.
- Park, E.-M., Cho, S., Frys, K., Racchumi, G., Zhou, P., Anrather, J., Iadecola, C., 2004. Interaction between inducible nitric oxide synthase and poly(ADP-ribose) polymerase in focal ischemic brain injury. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 35, 2896–2901.
- Paschen, W., Oláh, L., Mies, G., 2000. Effect of transient focal ischemia of mouse brain on energy state and NAD levels: no evidence that NAD depletion plays a major role in secondary disturbances of energy metabolism. *Journal of Neurochemistry* 75, 1675–1680.

- Paxinos, G., Franklin, K.B.J. 1997. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. San Diego, Academic Press.
- Perrotta, I., Brunelli, E., Sciangula, A., Conforti, F., Perrotta, E., Tripepi, S., Donato, G., Cassese, M., 2011. iNOS induction and PARP-1 activation in human atherosclerotic lesions: an immunohistochemical and ultrastructural approach. *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 20, 195–203.
- Pieper, A.A., Walles, T., Wei, G., Clements, E.E., Verma, A., Snyder, S.H., Zweier, J.L., 2000. Myocardial postischemic injury is reduced by polyADP-ribose polymerase-1 gene disruption. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 6, 271–282.
- Pinard, E., Engrand, N., 1999. [Physiopathology of cerebral ischemia]. *Annales Françaises D'anesthésie Et De Réanimation* 18, 574–582.
- Pineda, D., Ampurdanés, C., Medina, M.G., Serratos, J., Tusell, J.M., Saura, J., Planas, A.M., Navarro, P., 2012. Tissue plasminogen activator induces microglial inflammation via a noncatalytic molecular mechanism involving activation of mitogen-activated protein kinases and Akt signaling pathways and AnnexinA2 and Galectin-1 receptors. *Glia* 60, 526–540.
- Pinoit, J.-M., Bejot, Y., Rouaud, O., Benatru, I., Osseby, G.-V., Bonin, B., Gisselmann, A., Giroud, M., 2006. Dépression après un accident vasculaire cérébral, un handicap supplémentaire. *Presse Médicale* 35, 1789–1793.
- Pirro, M., Schillaci, G., Paltriccia, R., Bagaglia, F., Menecali, C., Mannarino, M.R., Capanni, M., Velardi, A., Mannarino, E., 2006. Increased ratio of CD31+/CD42- microparticles to endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26, 2530–2535.
- Polavarapu, R., Gongora, M.C., Yi, H., Ranganathan, S., Lawrence, D.A., Strickland, D., Yepes, M., 2007. Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* 109, 3270–3278.
- Racz, B., Hanto, K., Tapodi, A., Solti, I., Kalman, N., Jakus, P., Kovacs, K., Debreceni, B., Gallyas, F., Sumegi, B., 2010. Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: a new mechanism for the cytoplasmic effect of PARP-1 activation. *Free Radical Biology & Medicine* 49, 1978–1988.
- Rallidis, L.S., Zolindaki, M.G., Vikelis, M., Kaliva, K., Papadopoulos, C., Kremastinos, D.T., 2009. Elevated soluble intercellular adhesion molecule-1 levels are associated with poor short-term prognosis in middle-aged patients with acute ischaemic stroke. *International Journal of Cardiology* 132, 216–220.
- Rand, M.L., Wang, H., Bang, K.W.A., Packham, M.A., Freedman, J., 2006. Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 4, 1621–1623.
- Rank, A., Nieuwland, R., Crispin, A., Grütznert, S., Iberer, M., Toth, B., Pihusch, R., 2011. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets* 22, 111–116.
- Reijerkerk, A., Kooij, G., van der Pol, S.M.A., Leyen, T., van Het Hof, B., Couraud, P.-O., Vivien, D., Dijkstra, C.D., de Vries, H.E., 2008. Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181, 3567–3574.
- Rha, J.-H., Saver, J.L., 2007. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 38, 967–973.
- Ribo, M., Alvarez-Sabín, J., Montaner, J., Romero, F., Delgado, P., Rubiera, M., Delgado-Mederos, R., Molina, C.A., 2006. Temporal profile of recanalization after intravenous tissue plasminogen activator: selecting patients for rescue reperfusion techniques. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 37, 1000–1004.
- Riffell, J.L., Lord, C.J., Ashworth, A., 2012. Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nature Reviews. Drug Discovery* 11, 923–936.
- Roseblade, A., Luk, F., Rawling, T., Ung, A., Grau, G.E.R., Bebawy, M., 2013. Cell-derived microparticles: new targets in the therapeutic management of disease. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques* 16, 238–253.
- Rosell, A., Alvarez-Sabín, J., Arenillas, J.F., Rovira, A., Delgado, P., Fernández-Cadenas, I., Penalba, A., Molina, C.A., Montaner, J., 2005. A matrix metalloproteinase protein array reveals a strong relation between MMP-9 and MMP-13 with diffusion-weighted image lesion increase in human stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 36, 1415–1420.
- Rosenberg, G.A., Navratil, M., Barone, F., Feuerstein, G., 1996. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 16, 360–366.

- Rosenblum, W.I., 1997. Selective impairment of response to acetylcholine after ischemia/reperfusion in mice. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 28, 448–451; discussion 451–452.
- Rosenblum, W.I., 1998. A review of vasomotor responses of arterioles on the surface of the mouse brain: the necessary prelude to studies using genetically manipulated mice. *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 5, 129–138.
- Rosenblum, W.I., Wormley, B., 1995. Selective depression of endothelium-dependent dilations during cerebral ischemia. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 26, 1877–1881; discussion 1882.
- Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M.J., Kaufmann, S.H., Poirier, G.G., 2010. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature Reviews. Cancer* 10, 293–301.
- Rubiera, M., Alvarez-Sabín, J., Ribo, M., Montaner, J., Santamarina, E., Arenillas, J.F., Huertas, R., Delgado, P., Purroy, F., Molina, C.A., 2005. Predictors of early arterial reocclusion after tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute ischemic stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 36, 1452–1456.
- Sabatier, F., Roux, V., Anfosso, F., Camoin, L., Sampol, J., Dignat-George, F., 2002. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* 99, 3962–3970.
- Sairanen, T., Szepesi, R., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Saksi, J., Paetau, A., Lindsberg, P.J., 2009. Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke. *Acta Neuropathologica* 118, 541–552.
- Sapet, C., Simoncini, S., Loriod, B., Puthier, D., Sampol, J., Nguyen, C., Dignat-George, F., Anfosso, F., 2006. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood* 108, 1868–1876.
- Saqqur, M., Molina, C.A., Salam, A., Siddiqui, M., Ribo, M., Uchino, K., Calleja, S., Garami, Z., Khan, K., Akhtar, N., O'Rourke, F., Shuaib, A., Demchuk, A.M., Alexandrov, A.V., CLOTBUST Investigators, 2007a. Clinical deterioration after intravenous recombinant tissue plasminogen activator treatment: a multicenter transcranial Doppler study. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 38, 69–74.
- Saqqur, M., Uchino, K., Demchuk, A.M., Molina, C.A., Garami, Z., Calleja, S., Akhtar, N., Orouk, F.O., Salam, A., Shuaib, A., Alexandrov, A.V., CLOTBUST Investigators, 2007b. Site of arterial occlusion identified by transcranial Doppler predicts the response to intravenous thrombolysis for stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 38, 948–954.
- Saver, J.L., 2006. Time is brain—quantified. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 37, 263–266.
- Saver, J.L., 2011. Improving reperfusion therapy for acute ischaemic stroke. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 9 Suppl 1, 333–343.
- Schiera, G., Proia, P., Alberti, C., Mineo, M., Savettieri, G., Di Liegro, I., 2007. Neurons produce FGF2 and VEGF and secrete them at least in part by shedding extracellular vesicles. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11, 1384–1394.
- Schindler, S.M., Little, J.P., Klegeris, A., 2014. Microparticles: a new perspective in central nervous system disorders. *BioMed Research International* 2014, 756327.
- Schiro, A., Wilkinson, F.L., Weston, R., Smyth, J.V., Serracino-Inglott, F., Alexander, M.Y., 2014. Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* 234, 295–302.
- Schock, S.C., Edrissi, H., Burger, D., Cadonic, R., Hakim, A., Thompson, C., 2014. Microparticles generated during chronic cerebral ischemia deliver proapoptotic signals to cultured endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 450, 912–917.
- Schraufstatter, I.U., Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B., Spragg, R.G., Sklar, L.A., Cochrane, C.G., 1986. Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 4908–4912.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C., de Murcia, G., 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7, 517–528.
- Scolding, N.J., Morgan, B.P., Houston, W.A., Lington, C., Campbell, A.K., Compston, D.A., 1989. Vesicular removal by oligodendrocytes of membrane attack complexes formed by activated complement. *Nature* 339, 620–622.
- Scott, D.W., Dunn, T.S., Ballestas, M.E., Litovsky, S.H., Patel, R.P., 2013. Identification of a high-mannose ICAM-1 glycoform: effects of ICAM-1 hypoglycosylation on monocyte adhesion and outside in signaling. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 305, C228–237.
- Scott, G.S., Bowman, S.R., Smith, T., Flower, R.J., Bolton, C., 2007. Glutamate-stimulated peroxynitrite production in a brain-derived endothelial cell line is dependent on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation. *Biochemical Pharmacology* 73, 228–236.

- Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., Bréard, J., 2001. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology* 3, 346–352.
- Selaković, V., Colić, M., Jovanović, M., Raicević, R., Jovčić, A., 2003. Cerebrospinal fluid and plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1, vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule in patients with acute ischemic brain disease. *Vojnosanitetski Pregled. Military-Medical and Pharmaceutical Review* 60, 139–146.
- Seok, S.M., Kim, J.M., Park, T.Y., Baik, E.J., Lee, S.H., 2013. Fructose-1,6-bisphosphate ameliorates lipopolysaccharide-induced dysfunction of blood-brain barrier. *Archives of Pharmacol Research* 36, 1149–1159.
- Shan, L.-Y., Li, J.-Z., Zu, L.-Y., Niu, C.-G., Ferro, A., Zhang, Y.-D., Zheng, L., Ji, Y., 2013. Platelet-derived microparticles are implicated in remote ischemia conditioning in a rat model of cerebral infarction. *CNS neuroscience & therapeutics* 19, 917–925.
- Shibata, A., Kamada, N., Masumura, K.-I., Nohmi, T., Kobayashi, S., Teraoka, H., Nakagama, H., Sugimura, T., Suzuki, H., Masutani, M., 2005. Parp-1 deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements in vivo after treatment with an alkylating agent. *Oncogene* 24, 1328–1337.
- Shibata, A., Maeda, D., Ogino, H., Tsutsumi, M., Nohmi, T., Nakagama, H., Sugimura, T., Teraoka, H., Masutani, M., 2009. Role of Parp-1 in suppressing spontaneous deletion mutation in the liver and brain of mice at adolescence and advanced age. *Mutation Research* 664, 20–27.
- Shibata, M., Kumar, S.R., Amar, A., Fernandez, J.A., Hofman, F., Griffin, J.H., Zlokovic, B.V., 2001. Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke. *Circulation* 103, 1799–1805.
- Shi, G.Y., Hau, J.S., Wang, S.J., Wu, I.S., Chang, B.I., Lin, M.T., Chow, Y.H., Chang, W.C., Wing, L.Y., Jen, C.J., 1992. Plasmin and the regulation of tissue-type plasminogen activator biosynthesis in human endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 19363–19368.
- Shirafuji, T., Hamaguchi, H., Kanda, F., 2008. Measurement of platelet-derived microparticle levels in the chronic phase of cerebral infarction using an enzyme-linked immunosorbent assay. *The Kobe Journal of Medical Sciences* 54, E55–61.
- Siao, C.-J., Tsrka, S.E., 2002. Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, 3352–3358.
- Simak, J., Gelderman, M.P., Yu, H., Wright, V., Baird, A.E., 2006. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 4, 1296–1302.
- Simoncini, S., Njock, M.-S., Robert, S., Camoin-Jau, L., Sampol, J., Harlé, J.-R., Nguyen, C., Dignat-George, F., Anfosso, F., 2009. TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circulation Research* 104, 943–951.
- Skaper, S.D., 2003. Poly(ADP-Ribose) polymerase-1 in acute neuronal death and inflammation: a strategy for neuroprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 993, 217–228; discussion 287–288.
- Soares, B.P., Tong, E., Hom, J., Cheng, S.-C., Bredno, J., Bousset, L., Smith, W.S., Wintermark, M., 2010. Reperfusion is a more accurate predictor of follow-up infarct volume than recanalization: a proof of concept using CT in acute ischemic stroke patients. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 41, e34–40.
- Sodhi, R.K., Singh, N., Jaggi, A.S., 2010. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascular Pharmacology* 53, 77–87.
- Soriano, F.G., Pacher, P., Mabley, J., Liaudet, L., Szabó, C., 2001. Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Circulation Research* 89, 684–691.
- Strong, K., Mathers, C., Bonita, R., 2007. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurology* 6, 182–187.
- Sugama, Y., Tirupathi, C., offakidevi, K., Andersen, T.T., Fenton, J.W., Malik, A.B., 1992. Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *The Journal of Cell Biology* 119, 935–944.
- Sumii, T., Lo, E.H., 2002. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 33, 831–836.

- Sun, M., Zhao, Y., Gu, Y., Xu, C., 2012. Anti-inflammatory mechanism of taurine against ischemic stroke is related to down-regulation of PARP and NF- κ B. *Amino Acids* 42, 1735–1747.
- Suzuki, Y., Nagai, N., Umemura, K., 2011. Novel situations of endothelial injury in stroke--mechanisms of stroke and strategy of drug development: intracranial bleeding associated with the treatment of ischemic stroke: thrombolytic treatment of ischemia-affected endothelial cells with tissue-type plasminogen activator. *Journal of Pharmacological Sciences* 116, 25–29.
- Suzuki, Y., Nagai, N., Yamakawa, K., Kawakami, J., Lijnen, H.R., Umemura, K., 2009. Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. *Blood* 114, 3352–3358.
- Szabó, C., 2005. Roles of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society* 52, 60–71.
- Szabó, C., Zanchi, A., Komjáti, K., Pacher, P., Krolewski, A.S., Quist, W.C., LoGerfo, F.W., Horton, E.S., Veves, A., 2002. Poly(ADP-Ribose) polymerase is activated in subjects at risk of developing type 2 diabetes and is associated with impaired vascular reactivity. *Circulation* 106, 2680–2686.
- Szabó, G., Bährle, S., 2005. Role of nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in myocardial reperfusion injury. *Current Vascular Pharmacology* 3, 215–220.
- Tabrizi, P., Wang, L., Seeds, N., McComb, J.G., Yamada, S., Griffin, J.H., Carmeliet, P., Weiss, M.H., Zlokovic, B.V., 1999. Tissue plasminogen activator (tPA) deficiency exacerbates cerebrovascular fibrin deposition and brain injury in a murine stroke model: studies in tPA-deficient mice and wild-type mice on a matched genetic background. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19, 2801–2806.
- Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A., Dolo, V., 2002. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *The American Journal of Pathology* 160, 673–680.
- Tarui, T., Majumdar, M., Miles, L.A., Ruf, W., Takada, Y., 2002. Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 33564–33570.
- Teng, F., Beray-Berthet, V., Coqueran, B., Lesbats, C., Kuntz, M., Palmier, B., Garraud, M., Bedfert, C., Slane, N., Bérézowski, V., Szeremeta, F., Hachani, J., Scherman, D., Plotkine, M., Doan, B.-T., Marchand-Leroux, C., Margail, I., 2013. Prevention of rt-PA induced blood-brain barrier component degradation by the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor PJ34 after ischemic stroke in mice. *Experimental neurology* 248, 416–428.
- Teng, H., Chopp, M., Hozeska-Solgot, A., Shen, L., Lu, M., Tang, C., Zhang, Z.G., 2012. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 contribute to sonic hedgehog-induced in vitro cerebral angiogenesis. *PLoS One* 7, e33444.
- Terruso, V., D'Amelio, M., Di Benedetto, N., Lupo, I., Saia, V., Famoso, G., Mazzola, M.A., Aridon, P., Sarno, C., Ragonese, P., Savettieri, G., 2009. Frequency and determinants for hemorrhagic transformation of cerebral infarction. *Neuroepidemiology* 33, 261–265.
- Thomas, W.S., Mori, E., Copeland, B.R., Yu, J.Q., Morrissey, J.H., del Zoppo, G.J., 1993. Tissue factor contributes to microvascular defects after focal cerebral ischemia. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 24, 847–853; discussion 847.
- Tokime, T., Nozaki, K., Sugino, T., Kikuchi, H., Hashimoto, N., Ueda, K., 1998. Enhanced poly(ADP-ribosyl)ation after focal ischemia in rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18, 991–997.
- Turola, E., Furlan, R., Bianco, F., Matteoli, M., Verderio, C., 2012. Microglial microvesicle secretion and intercellular signaling. *Frontiers in Physiology* 3, 149.
- Ullrich, O., Diestel, A., Eyüpoglu, I.Y., Nitsch, R., 2001. Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nature Cell Biology* 3, 1035–1042.
- Van der Pol, E., Böing, A.N., Harrison, P., Sturk, A., Nieuwland, R., 2012. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews* 64, 676–705.
- VanWijk, M.J., VanBavel, E., Sturk, A., Nieuwland, R., 2003. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* 59, 277–287.
- Vemuganti, R., Dempsey, R.J., Bowen, K.K., 2004. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 protein expression by antisense oligonucleotides is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 35, 179–184.
- Verderio, C., Muzio, L., Turola, E., Bergami, A., Novellino, L., Ruffini, F., Riganti, L., Corradini, I., Francolini, M., Garzetti, L., Maiorino, C., Servida, F., Vercelli, A., Rocca, M., Dalla Libera, D., Martinelli, V., Comi, G.,

- Martino, G., Matteoli, M., Furlan, R., 2012. Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation. *Annals of Neurology* 72, 610–624.
- Veres, B., Radnai, B., Gallyas, F., Varbiro, G., Berente, Z., Osz, E., Sumegi, B., 2004. Regulation of kinase cascades and transcription factors by a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, 4-hydroxyquinazoline, in lipopolysaccharide-induced inflammation in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 310, 247–255.
- Viera, A.J., Mooberry, M., Key, N.S., 2012. Microparticles in cardiovascular disease pathophysiology and outcomes. *Journal of the American Society of Hypertension: JASH* 6, 243–252.
- Vion, A.-C., 2012. Thèse de Doctorat Université Paris Descartes. Contraintes mécaniques et microparticules endothéliales.
- Vion, A.-C., Ramkhelawon, B., Loyer, X., Chironi, G., Devue, C., Loirand, G., Tedgui, A., Lehoux, S., Boulanger, C.M., 2013. Shear stress regulates endothelial microparticle release. *Circulation Research* 112, 1323–1333.
- Virág, L., Szabó, C., 2002. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacological Reviews* 54, 375–429.
- Vivien, D., Gauberti, M., Montagne, A., Defer, G., Touzé, E., 2011. Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31, 2119–2134.
- Von Lukowicz, T., Hassa, P.O., Lohmann, C., Borén, J., Braunersreuther, V., Mach, F., Odermatt, B., Gersbach, M., Camici, G.G., Stähli, B.E., Tanner, F.C., Hottiger, M.O., Lüscher, T.F., Matter, C.M., 2008. PARP1 is required for adhesion molecule expression in atherogenesis. *Cardiovascular Research* 78, 158–166.
- Walker, J.W., Jijon, H.B., Madsen, K.L., 2006. AMP-activated protein kinase is a positive regulator of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, 336–341.
- Wang, C.X., Shuaib, A., 2007. Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury. *Progress in Neurobiology* 83, 140–148.
- Wang, C.X., Todd, K.G., Yang, Y., Gordon, T., Shuaib, A., 2001. Patency of cerebral microvessels after focal embolic stroke in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21, 413–421.
- Wang, C.X., Yang, T., Shuaib, A., 2006. Clot fragments formed from original thrombus obstruct downstream arteries in the ischemic injured brain. *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 13, 229–236.
- Wang, J.-M., Huang, Y.-J., Wang, Y., Xu, M.-G., Wang, L.-C., Wang, S.-M., Tao, J., 2007. Increased circulating CD31+/CD42- microparticles are associated with impaired systemic artery elasticity in healthy subjects. *American Journal of Hypertension* 20, 957–964.
- Wang, J., Zhang, X., Mu, L., Zhang, M., Gao, Z., Zhang, J., Yao, X., Liu, C., Wang, G., Wang, D., Kong, Q., Liu, Y., Li, N., Sun, B., Li, H., 2014. t-PA acts as a cytokine to regulate lymphocyte-endothelium adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical Immunology* 152, 90–100.
- Wang, Q., Tang, X.N., Yenari, M.A., 2007. The inflammatory response in stroke. *Journal of Neuroimmunology* 184, 53–68.
- Wang, X., Feuerstein, G.Z., 1995. Induced expression of adhesion molecules following focal brain ischemia. *Journal of Neurotrauma* 12, 825–832.
- Wang, X., Lee, S.-R., Arai, K., Lee, S.-R., Tsuji, K., Rebeck, G.W., Lo, E.H., 2003. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nature Medicine* 9, 1313–1317.
- Wang, X., Siren, A.L., Liu, Y., Yue, T.L., Barone, F.C., Feuerstein, G.Z., 1994. Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on brain microvascular endothelial cells in rat ischemic cortex. *Brain Research. Molecular Brain Research* 26, 61–68.
- Wang, X., Tsuji, K., Lee, S.-R., Ning, M., Furie, K.L., Buchan, A.M., Lo, E.H., 2004. Mechanisms of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 35, 2726–2730.
- Wang, Y., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 2009. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Experimental Neurology* 218, 193–202.
- Wang, Y., Koster, K., Lummer, M., Ragg, H., 2014. Origin of serpin-mediated regulation of coagulation and blood pressure. *PLoS ONE*, e97879.
- Warach, S., Latour, L.L., 2004. Evidence of reperfusion injury, exacerbated by thrombolytic therapy, in human focal brain ischemia using a novel imaging marker of early blood-brain barrier disruption. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 35, 2659–2661.

- Warlow, C., Sudlow, C., Dennis, M., Wardlaw, J., Sandercock, P., 2003. Stroke. *Lancet* 362, 1211–1224.
- Watanabe, T., Dohgu, S., Takata, F., Nishioku, T., Nakashima, A., Futagami, K., Yamauchi, A., Kataoka, Y., 2013. Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 36, 492–495.
- Wechsler, L.R., 2011. Intravenous thrombolytic therapy for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine* 364, 2138–2146.
- Weerheim, A.M., Kolb, A.M., Sturk, A., Nieuwland, R., 2002. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry* 302, 191–198.
- Weitz, J.I., Cruickshank, M.K., Thong, B., Leslie, B., Levine, M.N., Ginsberg, J., Eckhardt, T., 1988. Human tissue-type plasminogen activator releases fibrinopeptides A and B from fibrinogen. *The Journal of Clinical Investigation* 82, 1700–1707.
- Weitz, J.I., Leslie, B., Hudoba, M., 1998. Thrombin binds to soluble fibrin degradation products where it is protected from inhibition by heparin-antithrombin but susceptible to inactivation by antithrombin-independent inhibitors. *Circulation* 97, 544–552.
- Welling, T.H., Huber, T.S., Messina, L.M., Stanley, J.C., 1996. Tissue plasminogen activator increases canine endothelial cell proliferation rate through a plasmin-independent, receptor-mediated mechanism. *The Journal of Surgical Research* 66, 36–42.
- Weltin, D., Picard, V., Aupeix, K., Varin, M., Oth, D., Marchal, J., Dufour, P., Bischoff, P., 1995. Immunosuppressive activities of 6(5H)-phenanthridinone, a new poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor. *International Journal of Immunopharmacology* 17, 265–271.
- Werner, N., Wassmann, S., Ahlers, P., Kosiol, S., Nickenig, G., 2006. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26, 112–116.
- Wiernikowski, J.T., Crowther, M., Clase, C.M., Ingram, A., Andrew, M., Chan, A.K., 2000. Stability and sterility of recombinant tissue plasminogen activator at -30 degrees C. *Lancet* 355, 2221–2222.
- Willekens, F.L.A., Werre, J.M., Kruijt, J.K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Döpp, Y.A.M., van den Bos, A.G., Bosman, G.J.C.G.M., van Berkel, T.J.C., 2005. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* 105, 2141–2145.
- Williams, J.B., Jauch, E.C., Lindsell, C.J., Campos, B., 2007. Endothelial microparticle levels are similar in acute ischemic stroke and stroke mimics due to activation and not apoptosis/necrosis. *Academic Emergency Medicine: Official Journal of the Society for Academic Emergency Medicine* 14, 685–690.
- Wolberg, A.S., 2012. Determinants of fibrin formation, structure, and function. *Current Opinion in Hematology* 19, 349–356.
- Wolf, P., 1967. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology* 13, 269–288.
- Won, S., Lee, J.H., Wali, B., Stein, D.G., Sayeed, I., 2014. Progesterone attenuates hemorrhagic transformation after delayed tPA treatment in an experimental model of stroke in rats: involvement of the VEGF-MMP pathway. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34, 72–80.
- Writing group members, Lloyd-Jones, D., Adams, R.J., Brown, T.M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T.B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P.M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M.M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Mussolino, M., Nichol, G., Roger, V.L., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Roger, V.L., Stafford, R., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N.D., Wylie-Rosett, J., American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, 2010. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 121, e46–e215.
- Xu, S., Bai, P., Little, P.J., Liu, P., 2014. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) in atherosclerosis: from molecular mechanisms to therapeutic implications. *Medicinal Research Reviews* 34, 644–675.
- Yasaka, M., Yamaguchi, T., Yonehara, T., Moriyasu, H., 1994. Recurrent embolization during intravenous administration of tissue plasminogen activator in acute cardioembolic stroke. A case report. *Angiology* 45, 481–484.
- Yemisci, M., Gursoy-Ozdemir, Y., Vural, A., Can, A., Topalkara, K., Dalkara, T., 2009. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nature Medicine* 15, 1031–1037.
- Yepes, M., Roussel, B.D., Ali, C., Vivien, D., 2009. Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more

- than a thrombolytic. *Trends in Neurosciences* 32, 48–55.
- Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E.G., Bugge, T.H., Strickland, D.K., Lawrence, D.A., 2003. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *The Journal of Clinical Investigation* 112, 1533–1540.
- Yilmaz, G., Granger, D.N., 2008. Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurological Research* 30, 783–793.
- Yip, H.-K., Sun, C.-K., Tsai, T.-H., Sheu, J.-J., Kao, Y.-H., Lin, Y.-C., Shiue, Y.-L., Chen, Y.-L., Chai, H.-T., Chua, S., Ko, S.-F., Leu, S., 2013. Tissue plasminogen activator enhances mobilization of endothelial progenitor cells and angiogenesis in murine limb ischemia. *International Journal of Cardiology* 168, 226–236.
- Yoeruek, E., Spitzer, M.S., Tatar, O., Biedermann, T., Grisanti, S., Lüke, M., Bartz-Schmidt, K.U., Szurman, P., 2008. Toxic effects of recombinant tissue plasminogen activator on cultured human corneal endothelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49, 1392–1397.
- Zhang, C., An, J., Strickland, D.K., Yepes, M., 2009. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates tissue-type plasminogen activator-induced microglial activation in the ischemic brain. *The American Journal of Pathology* 174, 586–594.
- Zhang, L.-H., Wei, E.-Q., 2003. Neuroprotective effect of ONO-1078, a leukotriene receptor antagonist, on transient global cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 24, 1241–1247.
- Zhang, L., Chopp, M., Jia, L., Cui, Y., Lu, M., Zhang, Z.G., 2009. Atorvastatin extends the therapeutic window for tPA to 6 h after the onset of embolic stroke in rats. *Journal of cerebral blood flow & metabolism* 29, 1816–24.
- Zhang, R.L., Chopp, M., Zaloga, C., Zhang, Z.G., Jiang, N., Gautam, S.C., Tang, W.X., Tsang, W., Anderson, D.C., Manning, A.M., 1995. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat. *Brain Research* 682, 182–188.
- Zhang, R.L., Zhang, Z.G., Chopp, M., Zivin, J.A., 1999. Thrombolysis with tissue plasminogen activator alters adhesion molecule expression in the ischemic rat brain. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 30, 624–629.
- Zhang, S., Lin, Y., Kim, Y.-S., Hande, M.P., Liu, Z.-G., Shen, H.-M., 2007. c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation. *Cell Death and Differentiation* 14, 1001–1010.
- Zhang, X., Polavarapu, R., She, H., Mao, Z., Yepes, M., 2007. Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein mediate cerebral ischemia-induced nuclear factor-kappaB pathway activation. *The American Journal of Pathology* 171, 1281–1290.
- Zhang, Y., Fan, S., Yao, Y., Ding, J., Wang, Y., Zhao, Z., Liao, L., Li, P., Zang, F., Teng, G.-J., 2012. In vivo near-infrared imaging of fibrin deposition in thromboembolic stroke in mice. *PLoS One* 7, e30262.
- Zhang, Z., Chen, X., Li, L., Zhang, K., Tian, S., Gao, H., Li, H., 2013. t-PA reduces ischemic impairment of blood-brain barrier by strengthening endothelium junction. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 34, 1605–1611.
- Zhang, Z.G., Chopp, M., Goussev, A., Lu, D., Morris, D., Tsang, W., Powers, C., Ho, K.L., 1999. Cerebral microvascular obstruction by fibrin is associated with upregulation of PAI-1 acutely after onset of focal embolic ischemia in rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, 10898–10907.
- Zhang, Z.G., Zhang, L., Tsang, W., Goussev, A., Powers, C., Ho, K.L., Morris, D., Smyth, S.S., Coller, B.S., Chopp, M., 2001. Dynamic platelet accumulation at the site of the occluded middle cerebral artery and in downstream microvessels is associated with loss of microvascular integrity after embolic middle cerebral artery occlusion. *Brain Research* 912, 181–194.
- Zhao, B.-Q., Tejima, E., Lo, E.H., 2007. Neurovascular proteases in brain injury, hemorrhage and remodeling after stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 38, 748–752.
- Zhou, W., Liesz, A., Bauer, H., Sommer, C., Lahrmann, B., Valous, N., Grabe, N., Veltkamp, R., 2013. Postischemic brain infiltration of leukocyte subpopulations differs among murine permanent and transient focal cerebral ischemia models. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 23, 34–44.
- Zhu, Y., Sun, Y., Xie, L., Jin, K., Sheibani, N., Greenberg, D.A., 2003. Hypoxic induction of endoglin via mitogen-activated protein kinases in mouse brain microvascular endothelial cells. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 34, 2483–2488.
- Zingarelli, B., Cuzzocrea, S., Zsengellér, Z., Salzman, A.L., Szabó, C., 1997. Protection against myocardial ischemia and reperfusion injury by 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase. *Cardiovascular Research* 36, 205–215.
- Zingarelli, B., Hake, P.W., O'Connor, M., Denenberg, A., Kong, S., Aronow, B.J., 2003. Absence of poly(ADP-

- ribose)polymerase-1 alters nuclear factor-kappa B activation and gene expression of apoptosis regulators after reperfusion injury. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 9, 143–153.
- Zingarelli, B., Salzman, A.L., Szabó, C., 1998. Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation Research* 83, 85–94.
- Zuo, W., Chen, J., Zhang, S., Tang, J., Liu, H., Zhang, D., Chen, N., 2014. IMM-H004 prevents toxicity induced by delayed treatment of tPA in a rat model of focal cerebral ischemia involving PKA-and PI3K-dependent Akt activation. *The European Journal of Neuroscience* 39, 2107–2118.