



HAL
open science

Intérêt thérapeutique de nanoparticules d'oxyde de cérium innovantes pour l'ischémie cérébrale

Geoffroy Goujon

► **To cite this version:**

Geoffroy Goujon. Intérêt thérapeutique de nanoparticules d'oxyde de cérium innovantes pour l'ischémie cérébrale. Pharmacologie. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP5144 . tel-03685631

HAL Id: tel-03685631

<https://theses.hal.science/tel-03685631>

Submitted on 2 Jun 2022

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.



UNIVERSITÉ
PARIS
DESCARTES



Université de Paris

Université de Paris

École doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie et Imagerie (MTCI, ED 563)

*Laboratoires UMR S1140 « Innovations Thérapeutiques en Hémostase »
EA4475 « Pharmacologie de la Circulation Cérébrale »*

INTÉRÊT THÉRAPEUTIQUE DE NANOPARTICULES D'OXYDE DE CÉRIUM INNOVANTES POUR L'ISCHÉMIE CÉRÉBRALE

Par Geoffroy Goujon

Thèse de doctorat de Pharmacologie

Dirigée par le Professeur Isabelle Margail

Présentée et soutenue publiquement le 22 Octobre 2019

Devant le jury composé de :

Vincent BEREZOWSKI, PU, Lille 2
Hervé HILLAIREAU, MCU-HDR, Paris Saclay
Armelle BAEZA-SQUIBAN, PU, Paris Diderot
Sébastien FAURE, PU, Angers
Caroline ROQUES, MCU, Paris Descartes
Virginie BERAY-BERTHAT, MCU, Paris Descartes
Isabelle MARGAILL, PU, Paris Descartes

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Membre invité
Co –encadrant
Directrice de thèse



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

À ma grand-mère,
À mes parents,
À ma sœur,

REMERCIEMENTS

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet financé par l'Agence Nationale de la Recherche que je tiens à remercier, ainsi que tous les membres qui ont participé au projet, sans qui tout ce travail n'aurait pas été possible (ANR-15-CE18-0024).

Je tiens dans un premier temps à remercier les membres de mon jury pour avoir examiné mon travail avec intérêt :

Au **Professeur Vincent BEREZOWSKI** et au **Docteur Hervé HILLAIREAU** pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteur de cette thèse.

Aux **Professeurs Armelle BAEZA-SQUIBAN** et **Sébastien FAURE** pour avoir accepté d'être examinateur de mon travail et de siéger au sein de ce jury.

J'adresse tous mes remerciements à ma directrice de thèse, le **Professeur Isabelle Margail** et mes co-encadrantes, le **Docteur Virginie Beray-Berthot** et le **Docteur Caroline Roques**. Tout d'abord merci de m'avoir sélectionné et permis de travailler sur ce sujet de thèse au sein de ce votre passionnant projet. Merci pour leur pédagogie, patience, disponibilité et humilité. Je leur exprime ma profonde reconnaissance envers tous leurs nombreux conseils, relectures et corrections.

Je tiens également à remercier le **Docteur Nathalie Mignet** et le **Docteur Jean-François Berret** qui m'ont également accompagné lors de ce projet de thèse. Merci de m'avoir fait découvrir et partager vos domaines de recherche que je connaissais peu mais également pour votre grande disponibilité et vos conseils.

Je remercie le **Professeur Catherine Marchand Leroux** et le **Professeur Pascale Gaussem** pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire. Merci pour leurs conseils et disponibilités.

Je souhaiterais également remercier tous les partenaires du projet, nos réunions biennuelles ont permis de faire le point sur tous nos travaux, de discuter tous ensemble afin de fixer des objectifs communs pour le bon déroulement du projet. Ce travail très pluridisciplinaire m'a permis, grâce à votre pédagogie, d'obtenir des notions dans des domaines qui m'étaient jusqu'alors méconnus. Merci d'avoir répondu à mes questions et mes sollicitations dans les plus brefs délais.

J'adresse également mes remerciements à tous ceux qui m'ont aidé au sein de ce projet :

Au **Docteur Bruno Palmier**, qui a énormément contribué à ce projet que ce soit par ses compétences théoriques et techniques (team BTS !). Merci d'avoir été toujours disponible, de ne pas avoir compté ton temps pour m'aider au point que cela devienne gênant ! Merci l'artiste !

Au **Docteur Johanne Seguin**, qui a beaucoup contribué aux expériences de biodistribution et de toxicité mais également aux expériences de cultures cellulaires. Merci d'avoir toujours été disponible à mes (très nombreuses) sollicitations.

Au **Docteur Victor Baldim** pour ta disponibilité et participation au projet. Merci d'avoir synthésité autant de particules afin que je ne sois jamais bloqué dans mes travaux.

Aux **Docteurs Cédric Loubat** et **Alain Graillet** ainsi que leur nouvelle recrue **Nicolas Bia** pour votre pédagogie, disponibilité et sympathie. Et merci de nous avoir accueillis dans votre entreprise, chez vous, à Castries.

Au **technicien Bérard Coqueran** pour avoir activement participé au projet en me formant au modèle d'ischémie et en réalisant ces modèles au sein du projet. Merci d'avoir rendu plus agréables ces journées passées en salle d'ischémie.

À **Bruno Saubamea**, **Virginie Mignon** et **René Lai Kuen** pour leur aide et expertise sur la plateforme d'imagerie.

À **Valérie Nivet Antoine** pour m'avoir permis de doser des échantillons au sein de son service de biochimie de l'hôpital Necker.

Au **Docteur Paule Opolon** et **Olivia Bawa** pour leur aide technique et leurs expertises sur l'histologie.

Aux **Docteurs Rabah Gahoual** et **Hugo Salmon** pour leur expertise dans la fonctionnalisation et la détection de peptide.

À **Stephanie Bessoles** pour m'avoir permis de doser des échantillons sanguins.

Au **Docteur Aline Grein Iankovski** qui m'a initié à la fonctionnalisation des nanoparticules, merci pour ta sympathie et pédagogie.

À ma petite armée de stagiaire internationale : **Bathilde**, **Begoña**, **Léa**, **Patricia**, **Samuel** et **Youssef** ! Ce fut un plaisir de travailler avec vous, merci de votre implication active dans le projet et votre bonne humeur. Et j'espère que la relève sera assurée !

Je tiens à remercier tous les membres de l'**EA 4475** :

Au Professeur Michel Plotkine pour vos discussions enrichissantes.

Aux Docteurs Valérie Besson, Dominique Lerouet, Claire Leconte et Raymond Mongeau pour votre aide et vos encouragements.

A Nicole Crocci pour ta gentillesse, sympathie et pour tous ces déjeuners au crous.

A Audrey Lesturgie pour ta sympathie et ton aide.

Aux anciens étudiants désormais docteurs : Kahina, Célia et Toufik, merci pour tous ces moments agréables passés à vos côtés, pour votre sympathie et vos encouragements.

A mes co-thésards : Clément et Rémi, merci pour ces 3 années passées à vos côtés. Pour tous ces moments partagés au laboratoire et à l'extérieur. Pour votre sympathie et notre complicité sans faille.

A Albert, pour ta bonne humeur communicative et ces nombreux moments passés ensemble.

Je remercie également tous les membres de l'**UTCBS** :

Aux actuels et anciens doctorants : Lucie, Louise, Morgane, Brice, Thomas, Shayan, Doan ; merci pour votre sympathie, votre aide et tous ces moments partagés.

A Khair pour ta gentillesse et nos nombreuses discussions.

Au docteur Cyrille Richard pour votre sympathie, aide et vos nombreux conseils.

A Celine Hoffman, Virginie Escriou, Anne-Marie, et Yohann pour votre aide, votre gentillesse et vos nombreux conseils.

Enfin je remercie tous les membres de l'**UMR-1140** :

Aux Professeurs David Smadja et Catherine Boisson-Vidal pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe.

A Elisa, je suis reconnaissant pour la confiance que tu m'as accordée mais également pour ta sympathie et tes encouragements.

A Alison, pour tous ces moments partagés au laboratoire et à l'extérieur.

A Johan et Julie qui prendront la relève, merci pour votre sympathie.

Au docteur Eduardo Angles-Cano pour vos discussions, votre aide et vos encouragements.

A Sonia et Dominique pour votre gentillesse et vos discussions.

Enfin,

A mes parents Fabienne et Bruno, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui et qui m'ont donné la chance de faire des études. Merci pour leur amour inconditionnel, leur soutien à toutes épreuves, leur patience et exemplarité.

A ma grand-mère Nelly pour son amour, soutien et encouragement. A mes grands-parents Annie, Philippe et Jacques partis bien trop tôt.

A ma sœur Mathilde pour avoir été un exemple pour moi. Merci pour tous ces moments partagés, ton soutien et tes encouragements.

A ma chérie, pour son amour, ses encouragements et tous les moments passés ensemble.

Je remercie également toute ma famille ; tantes, oncles et cousins pour tous ces moments partagés ensemble.

A tous mes amis et particulièrement, Arnaud et Baptiste. Merci d'avoir toujours été là pour moi, pour votre gentillesse et pour tous ces moments partagés !

Je remercie également tous mes anciens collègues de travail, notamment Adrienne et Julie. Merci pour votre bonheur communicatif et tous ces moments passés ensemble ! Mais également tous mes collègues de l'institut Cochin, l'Institut du Cerveau et la Moelle épinière et de l'institut Pasteur.

RÉSUMÉ

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) constituent la 2^{ème} cause de mortalité dans le monde et la 1^{ère} chez les femmes en France. Pour les AVC ischémiques (AVCi), seules des stratégies de recanalisation pharmacologique ou mécanique ont été approuvées mais aucune stratégie protectrice n'est aujourd'hui disponible. Bien que le rôle délétère du stress oxydant ait été clairement établi dans les lésions neuronales et vasculaires à la suite d'une ischémie cérébrale (IC) dans les études précliniques, aucune stratégie antioxydante n'a démontré d'efficacité clinique à ce jour. Or, les nanoparticules d'oxyde de cérium (NPC) possèdent de multiples capacités antioxydantes (enzymatique et non enzymatique). Afin d'améliorer la biocompatibilité des NPC, la société Specific Polymers® a développé des copolymères de polyéthylène glycol (PEG)/ polyméthacrylate de méthyle/ phosphonate pour recouvrir leur surface. De plus, ces polymères peuvent être fonctionnalisés avec un peptide ciblant l'endothélium ce qui permettrait d'y concentrer l'effet antioxydant des NPC, afin de réduire la survenue d'hémorragies cérébrales, complications graves chez les patients victimes d'AVCi.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'impact du recouvrement des NPC sur leur potentiel thérapeutique dans l'IC. Les études ont été menées *in vitro* pour établir la toxicité, l'effet antioxydant et l'internalisation cellulaire des NPC et *in vivo*, pour examiner leur biodistribution et leur toxicité, ainsi que leur potentiel thérapeutique dans un modèle d'IC.

Les études *in vitro* ont été effectuées sur des cellules endothéliales cérébrales murines de la lignée bEnd.3. Nous avons démontré que les NPC n'induisaient ni mortalité, ni perturbation de l'activité métabolique jusqu'à 100µg/ml. A 1000µg/mL, les NPC nues augmentent la mortalité, contrairement aux NPC PEGylées. Nous avons modélisé l'excitotoxicité survenant lors d'une IC et qui contribue au stress oxydant, grâce à un traitement des cellules par le glutamate. L'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules bEnd.3 et l'oxydation des acides nucléiques dans ces conditions ont été réduites par les NPC, démontrant que leur recouvrement n'interfère pas avec leurs propriétés antioxydantes. La fonctionnalisation des NPC a permis le greffage d'un fluorophore pour suivre leur internalisation par cytométrie en flux et microscopie confocale. Nous avons ainsi mis en évidence que les NPC étaient rapidement internalisées dans les cellules bEnd.3. Des études de microscopie électronique ont ensuite montré que les NPC sont principalement localisées dans des endosomes périnucléaires. Enfin, nous avons réalisé le greffage sur les NPC d'un peptide ciblant une protéine d'adhésion vasculaire surexprimée lors de l'IC. La suite de ces études consistera à vérifier l'interaction spécifique de ces NPC avec la molécule d'adhésion.

Les études *in vivo* ont permis d'établir la biodistribution des NPC chez des souris Swiss : des NPC sont retrouvées durant les premières heures suivant leur injection, avant leur élimination par voie rénale. L'histopathologie n'a révélé aucune toxicité des NPC sur le foie, les reins, la rate, les poumons et le cerveau de ces souris et aucune modification de leur numération sanguine n'a été observée. Les NPC ont ensuite été administrées dans un modèle murin d'IC, mais n'ont pas réduit le volume de la lésion dans nos conditions.

En conclusion, le recouvrement des NPC par des polymères innovants a réduit leur toxicité sans altérer leurs capacités antioxydantes et leur internalisation dans des cellules endothéliales cérébrales. L'absence d'accumulation à long terme et de toxicité *in vivo* sont encourageantes quant à leur biocompatibilité. Bien que les NPC n'aient pas montré d'effet protecteur *in vivo*, celles ciblant l'endothélium pourraient réduire les lésions vasculaires et le risque hémorragique consécutif à une IC.

ABSTRACT

Stroke is the second leading cause of death in the world and the first cause of death among women in France. For ischemic stroke, only pharmacological or mechanical recanalization strategies have been approved, but no protective strategy is currently available. Indeed, although the deleterious role of oxidative stress has been clearly established in neuronal but also vascular lesions following cerebral ischemia in preclinical studies, no antioxidant strategy has been shown to be clinically effective as of yet. However, cerium oxide nanoparticles (CNP) present the advantage of having multiple antioxidant capacities (enzymatic and non-enzymatic). In order to improve the stability and biocompatibility of CNP, Specific Polymers® has developed innovative polyethylene glycol (PEG)/phosphonate copolymers to coat their surface. In addition, these polymers can be functionalized with a peptide that targets the endothelium. This is expected to concentrate the antioxidant effect of CNP in the vessels, in order to reduce the occurrence of cerebral haemorrhages, a serious complication in patients with ischemic stroke.

In this context, the aim of this thesis was to assess the impact of CNP's coating on their therapeutic potential in cerebral ischemia. On the one hand, studies were conducted *in vitro* to establish the toxicity, the antioxidant effect and the cellular internalisation of CNP. On the other hand, CNP's biodistribution and toxicity were assessed *in vivo* on healthy mice, while their therapeutic potential was evaluated in a mouse model of cerebral ischemia.

In vitro studies were performed on murine cerebral endothelial cells (bEnd.3 cell line). We showed that CNP do not induce mortality or disruption of metabolic activity up to 100µg/mL. At higher concentrations, all CNP induce a disruption of metabolic activity; bare CNP also cause mortality, unlike PEGylated CNP. Glutamate was then used on bEnd.3 cells to mimic the excitotoxicity that occurs during cerebral ischemia, as it contributes to oxidative stress. Under these conditions, the increase in the production of reactive oxygen species by bEnd.3 cells, as well as the oxidation of nucleic acids, were counteracted by CNP, demonstrating that their coating does not interfere with their antioxidant properties. Functionalization of CNP with a fluorophore (Cyanine 5) allowed monitoring their internalisation by cytometry and confocal microscopy. We highlighted that CNP are rapidly internalized in bEnd.3 cells. Electron microscopy studies showed that CNP are mainly localized in endosomes, at the perinuclear level. Finally, we were able to graft a peptide targeting a vascular adhesion protein overexpressed during cerebral ischemia. Further studies will be needed to evaluate the accumulation of grafted CNP at the target site, *i.e.* activated endothelial cells.

In vivo studies established the biodistribution of CNP in Swiss mice: CNP are found during the first hours after injection into mice, before renal elimination. Histopathology revealed no toxicity of the CNP on the liver, kidneys, spleen, lungs and brain of these mice, and no change in their blood counts was observed. CNP were also administered in a murine model of cerebral ischemia, but did not reduce the volume of the lesion under our conditions.

In conclusion, the coating of CNP by innovative polymers reduces their toxicity without altering their antioxidant capacities, or their internalization in cerebral endothelial cells. The absence of long-term accumulation and toxicity *in vivo* is promising for their biocompatibility. Although non-specific CNP did not show a protective effect *in vivo*, those capable of targeting the endothelium could reduce vascular lesions and the risk of haemorrhage due to cerebral ischemia.

PUBLICATION ET COMMUNICATIONS

▪ Publication

GOUJON Geoffroy¹⁻², V. Baldim³, C. Roques², N. Bia⁴, B. Palmier¹, Seguin J². A. Graillet⁴, C. Loubat⁴, N. Mignet², I. Margail¹, J.-F. Berret³ and V. Beray-Berthat². Toxicity and antioxidant activity of targeted cerium oxide nanoparticles stabilized with innovative functionalized copolymers (en préparation, ACS Nano).

¹ Université de Paris, UMR 1140 Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, F-75006 Paris, France.

² Université de Paris, U1022 Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé, INSERM, F-75006 Paris, France.

³ Université Paris Diderot, UMR 7057 Matière et Systèmes Complexes - Paris – France.

⁴ Specific Polymers, Castries, France.

▪ Communications orales

GOUJON Geoffroy¹⁻², ROQUES Caroline², BALDIM Victor³, GRAILLOT Alain⁴, Nicolas. Bia⁴, LOUBAT Cédric⁴, BERRET Jean-François³, MIGNET Nathalie², MARGAILL Isabelle¹, BERAY-BERTHAT Virginie¹ (2018). ANTIOXIDANT PROPERTIES OF INNOVATIVE POLYMER COATED CERIUM OXIDE NANOPARTICLES FOR STROKE TREATMENT.

Société Française de Nanomédecine (SFNano), 3 – 5 Décembre 2018, Montpellier, France.

GOUJON Geoffroy¹, C. Roques², V. Beray-Berthat¹, V. Baldim³, A. Graillet⁴, N. Bia⁴, C. Loubat⁴ J.-F. Berret³, N. Mignet², and I. Margail¹ (2018). Nanoparticules d'oxyde de cérium innovantes pour le traitement des accidents vasculaires cérébraux.

Journée annuelle de la Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires (SCMC), 15 Mars 2018, Paris, France. Prix de la meilleure communication orale.

- **Communications affichées**

GOUJON Geoffroy ^{1,2}, ROQUES Caroline ², BALDIM Victor ⁴, BIA Nicolas ⁵, GRAILLOT Alain ⁵, LOUBAT Cédric ⁵, PALMIER Bruno ¹, BERRET Jean-François ⁴, MIGNET Nathalie ², BERAY-BERTHAT Virginie ³, MARGAILL Isabelle ¹ (2019) INNOVATIVE POLYMER COATED CERIUM OXIDE NANOPARTICLES FOR CEREBROVASCULAR DISEASE.

21st International conference on oxidative stress reduction, redox homeostasis and antioxidants (Paris Redox World Congress), 20 – 21 Juin 2019, Paris, France.

GOUJON Geoffroy ^{1,2}, ROQUES Caroline ², BALDIM Victor ³, GRAILLOT Alain ⁴, LOUBAT Cédric ⁴, BERRET Jean-François ³, MIGNET Nathalie ², MARGAILL Isabelle ¹, BERAY-BERTHAT Virginie ¹ (2018) ANTIOXIDANT PROPERTIES OF INNOVATIVE POLYMER COATED CERIUM OXIDE NANOPARTICLES FOR STROKE TREATMENT.

10th International symposium on Neuroprotection and Neurorepair, 9 – 11 Octobre 2018, Dresde, Allemagne.

GOUJON Geoffroy ^{1,2}, BERAY-BERTHAT Virginie ¹, GRAILLOT Alain ⁴, LOUBAT Cédric ⁴, BERRET Jean-François ³, MIGNET Nathalie ², MARGAILL Isabelle¹, ROQUES Caroline ² (2018). ANTIOXIDANT PROPERTIES OF INNOVATIVE POLYMER COATED CERIUM OXIDE NANOPARTICLES FOR STROKE TREATMENT.

20st International conference on oxidative stress reduction, redox homeostasis and antioxidants (Paris Redox World Congress), 25– 26 Juin 2018, Paris, France

GOUJON Geoffroy ^{1,2}, BERAY-BERTHAT Virginie ¹, GRAILLOT Alain ⁴, LOUBAT Cédric ⁴, BERRET Jean-François ³, MIGNET Nathalie ², MARGAILL Isabelle¹, ROQUES Caroline ² (2018). ANTIOXIDANT PROPERTIES OF INNOVATIVE POLYMER COATED CERIUM OXIDE NANOPARTICLES FOR STROKE TREATMENT.

Journée scientifiques de l'écode doctorale MTCl, 21 – 22 Juin 2018, Paris, France.

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Représentation des différentes formes de l'accident vasculaire cérébral (AVC)..... | 12 |
| Figure 2 : Les 10 principales causes de mortalité en 2016..... | 13 |
| Figure 3 : Nombre d'AVC annuel enregistré à Dijon et projection jusqu'en 2030..... | 14 |
| Figure 4 : Campagne de sensibilisation au dépistage de l'AVC..... | 16 |
| Figure 5 : Représentation de l'évolution de la pénombre et du cœur de l'AVC. | 21 |
| Figure 6 : Représentation des mécanismes lésionnels après un AVC..... | 22 |
| Figure 7 : Fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. | 32 |
| Figure 8 : Représentation des différentes sources d'ERON..... | 37 |
| Figure 9 : Induction de l'excitotoxicité dans l'AVC ischémique..... | 46 |
| Figure 10 : Lien entre l'excitotoxicité et le stress oxydant dans l'AVC ischémique..... | 48 |
| Figure 11 : Inflammation vasculaire..... | 55 |
| Figure 12 : Transmigration des leucocytes..... | 57 |
| Figure 13 : Interaction de VCAM-1 avec VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), $\alpha 4\beta 7$ et galectine-3..... | 59 |
| Figure 14 : Détection de la forme soluble de VCAM-1 après une ischémie cérébrale. | 60 |
| Figure 15 : La barrière hémato-encéphalique..... | 63 |
| Figure 16 : Notion d'échelle du nanomonde..... | 76 |
| Figure 17 : Images de différentes géométries de NP d'or par microscopie électronique..... | 78 |
| Figure 18 : Surface d'interaction en fonction du volume..... | 79 |
| Figure 19 : Présentation des différents états de dispersion de NP colloïdales..... | 81 |
| Figure 20 : Mouvement brownien des particules..... | 82 |
| Figure 21 : Représentation des différents types de NP actuellement sur le marché. | 87 |
| Figure 22 : Composition et structure des NPC..... | 92 |
| Figure 23 : Propositions de mécanismes de l'activité SOD-like des NPC | 96 |
| Figure 24: Proposition de mécanisme de l'activité CAT-like des NPC..... | 97 |
| Figure 25 : Autorégénération des NPC..... | 100 |
| Figure 26 : Représentation schématique des NPC nues et recouvertes. | 115 |
| Figure 27 : Schéma et réaction du greffage de la cyanine-5 sur les NPC..... | 118 |
| Figure 28 : Schéma de la colonne d'exclusion de 30kDa..... | 119 |
| Figure 29 : Gamme étalon de cyanine 5..... | 119 |
| Figure 30 : Séquence du peptide ciblant et du peptide scramble..... | 120 |
| Figure 31 : Schéma du greffage du peptide sur les NPC..... | 121 |
| Figure 32 : Gammes étalon de peptide ciblant et de peptide scramble | 122 |
| Figure 33 : Principe du MTT..... | 125 |
| Figure 34 : Principe du dosage des ERO par la sonde H ₂ DCF-DA. | 127 |
| Figure 35 : Principe du dosage du glutathion..... | 130 |
| Figure 36 : Principe de la cytométrie en flux..... | 134 |
| Figure 37 : Modèle d'ischémie par injection de thrombine sur la souris..... | 142 |
| Figure 38 : Détermination de la concentration en cérium des suspensions de NPC..... | 149 |
| Figure 39 : Taille des nanoparticules d'oxyde de cérium par microscopie électronique..... | 151 |
| Figure 40 : Distribution des diamètres hydrodynamiques des NPC..... | 152 |
| Figure 41 : Distribution des diamètres hydrodynamiques des éléments présents dans le DMEM. ... | 153 |
| Figure 42 : Détermination de la concentration en amine des NPC..... | 156 |
| Figure 43 : Mesure de la fluorescence dans le surnageant..... | 157 |
| Figure 44 : Evolution de la concentration en cyanine dans les surnageants et les éluats. | 159 |

| | |
|---|-----|
| Figure 45 : Protocole d'évaluation de la mortalité par le bleu trypan..... | 169 |
| Figure 46 : Effet des différentes NPC sur la mortalité cellulaire (4h)..... | 169 |
| Figure 47 : Effet des différentes NPC sur la mortalité cellulaire (24h)..... | 170 |
| Figure 48 : Protocole d'évaluation de l'activité métabolique par le MTT..... | 171 |
| Figure 49 : Effet des différentes NPC sur l'activité métabolique (4h)..... | 171 |
| Figure 50 : Effet des différentes NPC sur l'activité métabolique (24h)..... | 172 |
| Figure 51 : Activité SOD-like des NPC nues et recouvertes..... | 176 |
| Figure 52 : Activité CAT- like des NPC nues et recouvertes..... | 177 |
| Figure 53 : Protocole de détection par l'H ₂ DCF-DA des ERO produits par les cellules bEnd.3. | 179 |
| Figure 54 : Effet de la NAC sur la production des ERO..... | 179 |
| Figure 55 : Effet des différentes NPC sur la production des ERO..... | 181 |
| Figure 56 : Effet du glutamate sur la production d'ERO par les cellules bEnd.3..... | 184 |
| Figure 57 : Effet de la NAC sur la production d'ERO induite par le glutamate..... | 185 |
| Figure 58 : Effet du glutamate et de la NAC sur la production des ERO par les cellules bEnd.3. | 185 |
| Figure 59 : Toxicité du glutamate..... | 187 |
| Figure 60 : Effet des différentes NPC sur la production des ERO induite par le glutamate (4h)..... | 190 |
| Figure 61 : Effet des différentes NPC sur la production des ERO induite par le glutamate (24h)..... | 191 |
| Figure 62 : Protocole de détection des anions superoxyde mitochondriaux..... | 195 |
| Figure 63 : Effet du glutamate et de l'H ₂ O ₂ sur la production d'anions superoxyde..... | 196 |
| Figure 64 : Effet des NPC sur la production d'anions superoxyde..... | 197 |
| Figure 65 : Effet du glutamate et des NPC ICONS 30 sur les concentrations de glutathion. | 200 |
| Figure 66 : Effet des NPC sur la consommation des thiols totaux induite par le glutamate..... | 201 |
| Figure 67 : Effet du glutamate et des NPC sur l'oxydation des acides nucléiques..... | 206 |
| Figure 68 : Internalisation des NPC dans les cellules bEnd.3 par ICP-OES. | 210 |
| Figure 69 : Interaction des NPC avec les cellules bEnd.3 évaluée par cytométrie en flux..... | 214 |
| Figure 70 : Internalisation et localisation des NPC par microscopie confocale..... | 217 |
| Figure 71 : Internalisation et localisation des NPC par microscopie confocale (63x).... | 218 |
| Figure 72 : Localisation subcellulaire des NPC par microscopie électronique à transmission..... | 220 |
| Figure 73 : Principales voies d'endocytose des nanoparticules..... | 222 |
| Figure 74 : Internalisation et localisation des NPC ciblant par microscopie confocale..... | 224 |
| Figure 75 : Pourcentage de cellules bEnd.3 exprimant VCAM-1..... | 228 |
| Figure 76 : Expression de VCAM-1 dans les cellules bEnd.3..... | 229 |
| Figure 77 : Méthodologie et évolution de la biodistribution des NPC chez la souris.. | 236 |
| Figure 78 : Evolution des concentrations des NPC chez la souris.. | 238 |
| Figure 79 : Evolution des concentrations de NPC dans le foie, la vessie et les reins..... | 241 |
| Figure 80 : Biodistribution des NPC dans les organes de souris..... | 243 |
| Figure 81 : Corrélation entre les données de fluorescence et de quantification des organes. | 243 |
| Figure 82 : Étude de biostrubution de NPC de 30nm chez des rats .. | 246 |
| Figure 83 : Effet des NPC sur la numération - formulation sanguine à 24h..... | 249 |
| Figure 84 : Effet des NPC sur la numération - formulation sanguine à 1 mois..... | 251 |
| Figure 85 : Effet des NPC sur l'activité ALAT et ASAT..... | 253 |
| Figure 86 : Effet des NPC sur différents organes analysés par histologie..... | 256 |
| Figure 87: Effet des NPC sur le volume de lésion des souris après une ischémie cérébrale. | 259 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau I : Perte cérébrale en fonction du temps après un AVC. | 17 |
| Tableau II : Incidence des transformations hémorragiques..... | 24 |
| Tableau III : Espèces réactives : Diversité et nature chimique..... | 31 |
| Tableau IV : Interactions possibles entre particules : origines et conséquences. | 83 |
| Tableau V : Effet antioxydant des NP sur des modèles d'ischémie cérébrale | 91 |
| Tableau VI : Activité antioxydante des NPC en milieu acellulaire..... | 95 |
| Tableau VII : Études évaluant l'effet antioxydant <i>in vitro</i> des NPC..... | 101 |
| Tableau VIII : Étude démontrant un effet antioxydant des NPC..... | 104 |
| Tableau IX : Effet antioxydant des NPC dans des modèles d'ischémie cérébrale..... | 106 |
| Tableau X : Taille et indice de polydispersité des NPC..... | 153 |
| Tableau XI : Détermination de la quantité de cyanine..... | 158 |
| Tableau XII : Rendement du greffage de la cyanine pour les NPC ICONS 30 et 36..... | 159 |
| Tableau XIII : Rendements des greffages réalisés en fonction du ratio cyanine / fonctions amines.. | 160 |
| Tableau XIV: Synthèse des rendements obtenus au cours des différents greffages de la cyanine. ... | 160 |
| Tableau XV : Équivalence optimale en peptide ciblant..... | 165 |
| Tableau XVI : Détermination de la quantité de peptide | 165 |
| Tableau XVII : Rendement du greffage du peptide | 166 |
| Tableau XVIII : Calcul des rendements de greffage du peptide ciblant et du peptide scramble | 166 |
| Tableau XIX : Effet des différentes NPC sur la production des ERO induite par le glutamate | 190 |
| Tableau XX : Effet des différentes NPC sur la production des ERO induite par le glutamate | 191 |
| Tableau XXI : Effet des NPC sur la production d'ERO sur différents types cellulaires..... | 193 |
| Tableau XXII : Anticorps utilisés pour la mise au point du modèle de surexpression de VCAM-1. | 227 |
| Tableau XXIII : Evolution des concentrations des NPC chez la souris. | 238 |
| Tableau XXIV: Evolution des concentrations de NPC dans les organes de souris..... | 241 |
| Tableau XXV : Équations de la droite et corrélation des données d'imagerie et de quantification ... | 244 |
| Tableau XXVI : Effet des NPC sur la numération - formulation sanguine..... | 246 |
| Tableau XXVII : Effet des NPC sur la numération - formulation sanguine..... | 251 |

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| ABBRÉVIATIONS | 1 |
| PRÉFACE | 6 |
| RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES | 10 |
| PREMIÈRE PARTIE : Les Accidents Vasculaires Cérébraux | 10 |
| 1) Définitions | 10 |
| 2) Classification des AVC | 10 |
| 2.1) L'AVC hémorragique | 10 |
| 2.2) L'AVC ischémique | 11 |
| 3) Epidémiologie | 12 |
| 4) Facteurs de risques | 15 |
| 5) Symptômes et Diagnostic | 16 |
| 6) Pronostic après les AVC et AIT | 18 |
| 7) Physiopathologie des AVC ischémiques | 19 |
| 7.1) Physiopathologie spatiale de l'AVC : | 20 |
| 7.2) Physiopathologie temporelle de l'AVC : | 21 |
| 8) Traitements spécifiques de l'AVC ischémique aigu | 22 |
| 8.1) La thrombolyse..... | 22 |
| 8.1.1) Données cliniques de la thrombolyse | 22 |
| 8.1.2) L'efficacité limitée du rt-PA..... | 24 |
| 8.1.3) Toxicité vasculaire du rt-PA..... | 24 |
| 8.2) Thrombectomie..... | 27 |
| DEUXIÈME PARTIE : Le stress oxydant dans l'ischémie cérébrale : état de l'art et perspectives thérapeutiques | 30 |
| 1) Génération des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote | 31 |
| 1.1) L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) | 31 |
| 1.1.1) La mitochondrie | 31 |
| 1.1.2) Famille des NADPH - oxydases (NOX) | 32 |
| 1.1.3) Autres sources de production de l'anion superoxyde | 33 |
| 1.2) Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)..... | 34 |
| 1.3) Le monoxyde d'azote ($\bullet NO$)..... | 34 |
| 1.4) L'anion peroxynitrite ($ONOO^-$) | 35 |
| 1.5) Les radicaux libres | 36 |
| 2) Systèmes antioxydants endogènes | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1) Systèmes enzymatiques | 38 |
| 2.2) Systèmes non enzymatiques | 39 |
| 3) Rôle physiologique des ERON | 40 |
| 4) Rôles délétères des ERON..... | 41 |
| 4.1) Oxydation des protéines | 41 |
| 4.1.1) Oxydation des acides aminés | 41 |
| 4.1.1.1) Oxydation des cystéines..... | 41 |
| 4.1.1.2) Oxydation de la tyrosine (Tyr) et du tryptophane (Trp)..... | 42 |
| 4.1.2) Génération de protéines carbonylées et nitrosylées | 42 |
| 4.1.3) Oxydation et fragmentation du squelette protéique | 43 |
| 4.2) Oxydation des lipides | 43 |
| 4.3) Oxydation des acides nucléiques | 44 |
| 4.4) Glucides | 45 |
| 5) Stress oxydant et ischémie cérébrale | 45 |
| 5.1) Origine du stress oxydant au cours de l'ischémie cérébrale..... | 45 |
| 5.1.1) Excitotoxicité | 45 |
| 5.1.2) Dysfonctionnement mitochondrial | 48 |
| 5.1.3) Activation des enzymes produisant des espèces réactives : cyclooxygénases, lipoxygénases, xanthine oxydoréductase, NADPH-oxydases et NO-synthases (NOS) | 49 |
| 5.1.4) Neuroinflammation..... | 51 |
| 5.2) Mise en évidence du stress oxydant au cours d'une ischémie cérébrale | 52 |
| 5.2.1) Dans les modèles animaux..... | 52 |
| 5.2.2) En clinique | 53 |
| 5.3) Conséquences vasculaires du stress oxydant au cours de l'ischémie cérébrale | 54 |
| 5.3.1) Inflammation vasculaire | 54 |
| 5.3.1.1) Molécules d'Adhérence Cellulaire (CAM) et infiltration leucocytaire | 56 |
| 5.3.1.2) Focus sur VCAM-1, cible de nos nanoparticules | 58 |
| 5.3.1.2.1) Généralités | 58 |
| 5.3.1.2.2) VCAM-1 dans l'ischémie cérébrale | 60 |
| 5.3.2) BHE et transformations hémorragiques | 61 |
| 5.3.2.1) Perturbations de la BHE | 61 |
| 5.3.2.2) Transformations hémorragiques..... | 64 |
| 6) Traitements antioxydants dans l'ischémie cérébrale | 64 |
| 6.1) Stratégies antioxydantes dans les études précliniques | 64 |
| 6.1.1) Inhibition de la production d'espèces réactives | 64 |
| 6.1.2) Capture des espèces réactives | 66 |

| | |
|---|-----------|
| 6.1.3) Augmentation de la dégradation des espèces réactives | 69 |
| 6.1.4) Inhibition des récepteurs glutamatergiques | 71 |
| 6.2) Stratégies antioxydantes dans les essais cliniques | 72 |
| TROISIÈME PARTIE : Les Nanoparticules | 76 |
| 1) Généralités | 76 |
| 1.1) Définitions | 76 |
| 1.2) Caractérisation des Nanoparticules | 77 |
| 1.2.1) Dimensions | 77 |
| 1.2.2) Formes | 78 |
| 1.2.3) Taille | 79 |
| 1.2.4) Structure | 80 |
| 1.2.5) Charge | 80 |
| 1.2.6) Dispersions | 81 |
| 1.2.7) Interaction des NP | 81 |
| 1.3) Applications des nanoparticules | 83 |
| 2) Nanoparticules et médicaments | 84 |
| 2.1) Historique | 84 |
| 2.2) Applications des nano-médicaments | 85 |
| 2.1.1) Encapsulation | 85 |
| 2.1.2) Amélioration de l'efficacité et diminution de la toxicité | 86 |
| 2.1.3) Ciblage | 86 |
| 2.3) Marché des nano-médicaments | 87 |
| 2.4) Développement et essai clinique | 88 |
| 3) Nanoparticules et stress Oxydant | 88 |
| 4) Nanoparticules et ischémie | 89 |
| 5) Les Nanoparticules d'oxyde de cérium | 92 |
| 5.1) Généralités | 92 |
| 5.2) Recouvrements des NPC | 93 |
| 5.3) Capacités antioxydantes des NPC | 94 |
| 5.3.1) Activités Antioxydantes « Enzymatiques » des NPC | 96 |
| 5.3.1.1) Activités de type SOD et CAT | 96 |
| 5.3.1.2) Autres activités enzymatiques | 98 |
| 5.3.2) Capture des ERO | 99 |
| 5.3.3) Capacités autorégénératrices des NPC | 99 |
| 5.4) Evaluation de l'activité antioxydante des NPC <i>in vitro</i> | 101 |
| 5.4.1) Evaluation de l'activité antioxydante des NPC <i>in vivo</i> | 103 |

| | |
|---|------------|
| 5.4.2) Utilisation des NPC antioxydantes dans l'ischémie cérébrale | 105 |
| BUT DU TRAVAIL | 110 |
| MATÉRIELS ET MÉTHODES | 114 |
| 1) Préparation des nanoparticules | 114 |
| 1.1) Matériels | 114 |
| 1.2 Greffage des recouvrements | 114 |
| 1.3) Caractérisation des NPC..... | 115 |
| 1.3.1) Concentration en cérium des suspensions de NPC..... | 115 |
| 1.3.2) Potentiel zêta des NPC | 116 |
| 1.3.3) Taille des NPC..... | 116 |
| 1.3.4) Dosage des fonctions amines..... | 117 |
| 1.4) Fonctionnalisation des NPC | 117 |
| 1.4.1) Greffage de la cyanine..... | 117 |
| 1.4.2) Greffage de peptides..... | 120 |
| 2) Études <i>in vitro</i> | 123 |
| 2.1) Culture cellulaire | 123 |
| 2.1.1) Expansion des cellules..... | 123 |
| 2.1.2) Cultures des cellules..... | 123 |
| 2.2) Étude de la toxicité..... | 124 |
| 2.2.1) Évaluation de la mortalité cellulaire par le bleu trypan..... | 124 |
| 2.2.2) Mesure de l'activité métabolique | 125 |
| 2.3) Évaluation de l'effet antioxydant des NPC..... | 126 |
| 2.3.1) Mesure de la production d'ERO | 126 |
| 2.3.1.1) Mesure de la production totale d'ERO..... | 126 |
| 2.3.1.2) Mesure de la production mitochondriale d'anions superoxydes | 127 |
| 2.3.2) Évaluation de la consommation des systèmes antioxydants..... | 128 |
| 2.3.2.1) Mesure des thiols totaux..... | 128 |
| 2.3.2.2) Mesure du glutathion..... | 129 |
| 2.3.3) Évaluation des conséquences du stress oxydant | 130 |
| 2.4) Etude de l'internalisation des NPC dans les cellules bEnd.3..... | 131 |
| 2.4.1) Quantification de l'internalisation des NPC dans les cellules bEnd.3 | 132 |
| 2.4.1.1) Analyse quantitative de l'internalisation des NPC par ICP-OES..... | 132 |
| 2.4.1.2) Évaluation par cytométrie en flux..... | 133 |
| 2.4.2) Localisation intracellulaire des NPC | 134 |
| 2.4.2.1) Evaluation par microscopie à fluorescence | 134 |
| 2.4.2.2) Microscopie électronique | 135 |

| | |
|--|------------|
| 2.4.3) Ciblage de VCAM par les NPC dans les cellules bEnd.3..... | 136 |
| 2.4.3.1) Localisation des NPC ciblantes par microscopie électronique..... | 136 |
| 2.4.3.2) Mise au point du modèle de sur-expression de VCAM..... | 137 |
| 3) Études in vivo..... | 138 |
| 3.1) Animaux | 138 |
| 3.2) Biodistribution et toxicité des NPC..... | 138 |
| 3.2.1) Design de l'étude..... | 138 |
| 3.2.2) Imagerie | 138 |
| 3.2.3) NFS | 139 |
| 3.2.4) Histologie..... | 139 |
| 3.2.5) Quantification des NPC | 140 |
| 3.2.5.1) Quantification de la cyanine | 140 |
| 3.2.6) Dosage sanguin des transaminases hépatiques (ASAT/ ALAT) | 141 |
| 3.3) Modèle d'ischémie cérébrale par injection de thrombine dans la ACM | 141 |
| 3.4) Étude de l'effet des ICONS 73 dans l'ischémie cérébrale | 143 |
| 3.4.1) Modèle | 143 |
| 3.4.2) Volume de lésion..... | 143 |
| 3.4.3) Thiols totaux sérologiques | 144 |
| RÉSULTATS | 148 |
| PREMIÈRE PARTIE : Caractérisation et fonctionnalisation des NPC..... | 148 |
| 1) Caractérisation des NPC | 148 |
| 1.1) Détermination de la concentration en cérium des suspensions de NPC..... | 148 |
| 1.1.1) Protocole | 148 |
| 1.1.2) Résultats..... | 148 |
| 1.1.3) Discussion..... | 149 |
| 1.2) Potentiel zêta des NPC..... | 149 |
| 1.2.1) Protocole | 149 |
| 1.2.2) Résultats..... | 150 |
| 1.2.3) Discussion..... | 150 |
| 1.3) Taille des NPC..... | 150 |
| 1.3.1) Protocole | 150 |
| 1.3.2) Résultats..... | 151 |
| 1.3.3) Discussion..... | 154 |
| 2) Fonctionnalisation des NPC | 155 |
| 2.1) Dosage des fonctions amines..... | 155 |
| 2.1.1) Protocole | 155 |

| | |
|---|------------|
| 2.1.2) Résultats..... | 155 |
| 2.1.3) Discussion..... | 156 |
| 2.2) Greffage de la cyanine..... | 157 |
| 2.2.1) Principe et Protocole de vérification du greffage | 157 |
| 2.2.2) Résultats..... | 158 |
| 2.2.3) Discussion..... | 160 |
| 2.3) Greffage du peptide | 163 |
| 2.3.1) Principe et Protocole..... | 163 |
| 2.3.2) Résultats..... | 164 |
| 2.3.3) Discussion..... | 166 |
| DEUXIÈME PARTIE : Étude de l'effet des NPC in vitro | 168 |
| 1) Études de toxicité | 168 |
| 1.1) Mortalité cellulaire..... | 168 |
| 1.1.1) Protocole | 168 |
| 1.1.2) Résultats..... | 169 |
| 1.2) Activité métabolique | 170 |
| 1.2.1) Protocole | 170 |
| 1.2.2) Résultats..... | 171 |
| 1.3) Discussion..... | 172 |
| 2) Activité antioxydante des NPC..... | 175 |
| 2.1) Etude préliminaire : Activité SOD et CAT-like des NPC | 175 |
| 2.1.1) Principe et Protocole..... | 176 |
| 2.1.2) Résultats..... | 176 |
| 2.1.3) Discussion..... | 177 |
| 2.2) Activités antioxydantes des NPC in vitro..... | 178 |
| 2.2.1.) Effet antioxydant des NPC en condition physiologique | 178 |
| 2.2.1.1) Protocole | 178 |
| 2.2.1.2) Résultats..... | 179 |
| 2.2.1.2) Discussion..... | 182 |
| 2.2.2) Effet antioxydant des NPC en condition de stress | 183 |
| 2.2.2.1) Mise au point du modèle de stress oxydant | 183 |
| 2.2.2.1.1) Induction de la production d'ERO par le glutamate aux temps précoces | 183 |
| 2.2.2.1.1.1) Principe et protocole..... | 183 |
| 2.2.2.1.1.2) Résultats..... | 183 |
| 2.2.2.2) Induction de la production d'ERO par le glutamate à 24h..... | 185 |
| 2.2.2.3) Evaluation de la toxicité induite par le glutamate. | 186 |

| | |
|--|------------|
| 2.2.1.3.1) Protocole | 186 |
| 2.2.1.3.2) Résultats | 186 |
| 2.2.1.4) Discussion | 187 |
| 2.2.2.2) Effet des NPC sur le stress oxydant induit par le glutamate | 189 |
| 2.2.2.2.1) Protocole | 189 |
| 2.2.2.2.2) Résultats | 189 |
| 2.2.2.2.3) Discussion | 192 |
| 2.2.2.3) Effet du glutamate et des NPC sur la production mitochondriale d'anions superoxyde | 195 |
| 2.2.2.3.1) Protocole | 195 |
| 2.2.2.3.2) Résultats | 196 |
| 2.2.2.3.3) Discussion | 197 |
| 2.2.2.4) Effet des NPC sur la consommation des antioxydants endogènes | 198 |
| 2.2.2.4.1) Effet des NPC sur la consommation de glutathion au cours d'un stress oxydant | 199 |
| 2.2.2.4.1.1) Protocole | 199 |
| 2.2.2.4.1.2) Résultats | 199 |
| 2.2.2.4.2) Effet des NPC sur la consommation de thiols totaux au cours d'un stress oxydant | 200 |
| 2.2.2.4.2.1) Protocole | 200 |
| 2.2.2.4.2.2) Résultats | 201 |
| 2.2.2.4.3) Discussion | 202 |
| 2.2.2.5) Effet des NPC sur les dommages liés au stress oxydant | 204 |
| 2.2.2.5.1) Protocole | 204 |
| 2.2.2.5.2) Résultats | 204 |
| 2.2.2.5.3) Discussion | 206 |
| 2.2.2.6) Conclusion générale sur l'activité antioxydante des NPC | 208 |
| 3) Internalisation et localisation des NPC dans les cellules bEnd.3 | 209 |
| 3.1) Quantification de l'internalisation des NPC dans les cellules bEnd.3 | 209 |
| 3.1.1) Analyse quantitative de l'internalisation des NPC par ICP-OES | 209 |
| 3.1.1.1) Protocole | 209 |
| 3.1.1.2) Résultats | 209 |
| 3.1.1.3) Discussion | 210 |
| 3.1.2) Analyse quantitative par cytométrie en flux | 212 |
| 3.1.2.1) Protocole | 212 |
| 3.1.2.2) Résultats | 212 |
| 3.1.2.3) Discussion | 214 |

| | |
|--|------------|
| 3.2) Localisation intracellulaire des NPC | 216 |
| 3.2.1) Localisation intracellulaire des NPC par microscopie confocale..... | 216 |
| 3.2.1.1) Protocole | 216 |
| 3.2.1.2) Résultats | 216 |
| 3.2.1.3) Discussion..... | 218 |
| 3.2.2) Localisation subcellulaire des NPC par microscopie électronique à transmission ... | 219 |
| 3.2.2.1) Protocole | 219 |
| 3.2.2.2) Résultats | 219 |
| 3.2.2.3) Discussion..... | 221 |
| 3.3) Ciblage de VCAM-1 par les NPC dans les cellules bEnd.3 | 222 |
| 3.3.1) Localisation des NPC ciblantes par microscopie à fluorescence..... | 223 |
| 3.3.1.1) Protocole | 223 |
| 3.3.1.2) Résultats | 223 |
| 3.3.1.3) Discussion..... | 224 |
| 3.3.2) Mise au point d'un modèle de surexpression de VCAM-1..... | 226 |
| 3.3.2.1) Protocole | 226 |
| 3.3.2.2) Résultats | 227 |
| 3.3.2.3) Discussion..... | 230 |
| 3.3.3) Expériences préliminaires et perspectives pour valider la spécificité des NPC ciblantes | 232 |
| TROISIÈME PARTIE : Étude de l'effet des NPC <i>in vivo</i> | 234 |
| 1) Biodistribution des NPC..... | 234 |
| 1.1) Biodistribution des NPC par imagerie sur la souris entière | 235 |
| 1.1.1) Protocole | 235 |
| 1.1.2) Résultats | 235 |
| 1.1.3) Discussion..... | 241 |
| 1.2) Quantifications des NPC dans les organes | 242 |
| 1.2.1) Protocole | 242 |
| 1.2.2) Résultats | 242 |
| 1.2.3) Discussion..... | 244 |
| 2) Toxicité des NPC..... | 247 |
| 2.1) Effet des NPC sur la numération-formule sanguine..... | 247 |
| 2.1.1) Protocole | 247 |
| 2.1.2) Résultats | 247 |
| 2.1.3) Discussion..... | 251 |
| 2.2) Effet des NPC sur les transaminases hépatiques | 252 |

| | |
|---|------------|
| 2.3.1) Principe et Protocole..... | 252 |
| 2.3.2) Résultats..... | 253 |
| 2.3.3) Discussion..... | 254 |
| 2.3) Etude histologique de la toxicité des NPC..... | 254 |
| 2.3.1) Protocole | 254 |
| 2.3.2) Résultats..... | 255 |
| 2.3.3) Discussion..... | 256 |
| 3) Potentiel thérapeutique des NPC sur un modèle murin d'ischémie cérébrale..... | 258 |
| 3.1) Protocole | 258 |
| 3.2) Résultats | 258 |
| 3.3) Discussion..... | 259 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... | 264 |
| RÉFÉRENCES..... | 272 |

ABRÉVIATIONS

| | | | |
|--------------------|--|---------------------------------|--|
| •NO : | Monoxyde d'azote | ERON : | Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote |
| 3-NT : | 3- Nitrotyrosine | ETC : | Chaîne de transport des électrons |
| 4-HNE : | 4-Hydroxynonéal | FDA : | Food and Drug Administration |
| 8-OHdG : | 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine | GPx : | Glutathion peroxydase |
| AA : | Acide Arachidonique | GSH : | Glutathion réduit |
| AGPI : | Acides gras polyinsaturés | GSSG : | Glutathion oxydé |
| AIT : | Accident Ischémique Transitoire | H ₂ O ₂ : | Peroxyde d'hydrogène |
| ALA : | Acide α-lipoïque | HETE : | Acide hydroxy-eicosatétraénoïque |
| AMPA : | α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4propionate | HO• : | Radical hydroxyl |
| AMPK : | Adénine monophosphate activated protein kinase | HPETE : | hydroxyperoxy-eicosatétraénoïque |
| ATP : | Adénosine triphosphate | ICAM-1 : | Molécule d'adhérence intracellulaire |
| AVC : | Accident Vasculaire Cérébrale | ICONS : | Innovative Cerium Oxide Nanoparticles for Stroke |
| Aβ : | β-Amyloïde | IL : | Interleukine |
| bEnd.3 : | brain Endothelial cells | IRM : | Imagerie par résonance magnétique |
| BHE : | Barrière Hémato-Encéphalique | IV : | Intraveineuse |
| CAM : | Molécules d'adhérence cellulaire | LCR : | Liquide céphalo-rachidien |
| CAT : | Catalase | LO•/LOO• : | Radicaux lipidique |
| CeO ₂ : | Oxyde de cérium | LOOH : | Hydroperoxydes lipidique |
| COX : | Cyclo-oxygénases | LOX : | Lipoxygénases |
| CRM : | Chaîne respiratoire mitochondriale | LPS : | Lipopolysaccharides |
| DHA : | Acide dehydroascorbique | MCAO : | Occlusion de l'artère cérébrale moyenne |
| DLS : | Diffusion dynamique de la lumière | MDA : | Malondialdéhyde |
| DSC : | Débit sanguin cérébral | MeNP : | Nanoparticules de mélanine |
| ERN : | Espèces réactives de l'azote | mGlu : | Récepteurs glutamatergiques métabotropiques |
| ERO : | Espèces réactives de l'oxygène | | |

| | | | |
|---------------------|---|------------|--|
| MMP : | Métalloprotéases de la matrice | PSPM : | 3-sulfopropylmethacrylate |
| NAC : | N-acétylcystéine | R – SSH : | Persulfure |
| NADPH : | Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate | RO•/ROO• : | Radicaux oxygénés |
| NF- κB : | Facteur nucléaire kappa B | ROSIER : | Recognition Of Stroke In the Emergency Room |
| NIHSS : | National Institutes of Health Stroke Scale | R-S- : | Radicaux thiolate |
| NMDA : | N-méthyl-D-aspartate | RS• : | Radicaux thiyle |
| NOS : | NO - synthase | RSS• : | Radicaux perthiyles |
| NOX : | NADPH - oxydases | rt-PA : | Activateur tissulaire du plasminogène recombinant |
| NP : | Nanoparticules | SEDAN : | S ugar, - E arly Infact signs, D ense cerebral artery signe A ge et score NIHSS |
| NPC | Nanoparticules d'oxyde de cérium | SH : | Fonction thiol |
| NXY-059 : | 2,4-disulfophenyl-Ntert-butylnitronne | SNC : | Système nerveux central |
| O ₂ •- : | Anion superoxyde | SOD : | Superoxyde dismutase |
| OA : | Acide Oléique | STAIR : | Stroke Therapy Academic Industry Roundtable |
| OGD | Privation en oxygène et glucose | TBARS : | Substances réactives à l'acide thiobarbiturique |
| ONOO- : | Anion peroxydinitrite | tBHP : | Tert-butyl hydroperoxyde |
| PAA : | Acide poly acrylique | TEM : | Microscopie électronique |
| PAAOA : | Acide poly acrylique-octylamine | TEMPOL : | 4-hydroxy-2,2,6,6-tétraméthylpiperidine-N-oxyl |
| PBCA : | Polybutylcyanoacrylate | TH : | Transformation Hémorragique |
| PBN : | αphenyl- tert-butyl nitronne | TNFα : | Facteur de nécrose tumorale |
| PECAM : | Molécule d'adhérence des cellules endothéliales | TOAST : | Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment |
| PEG : | Polyéthylène glycol | Trp : | Tryptophane |
| PEI: | Polyéthylèneimine | Trx : | Thiorédoxine |
| PKC : | Protein kinase C | Tyr : | Tyrosine |
| PLGA : | Poly(acide lactique co-glycolique) | VCAM-1 : | Molécule d'adhérence vasculaire |
| PMN : | Polynucléaires neutrophiles | VLA-4 : | Very Late Antigen-4 |
| ppm : | Partie par million | XOR : | Xanthine oxydoréductase |
| Prx : | Peroxydases | ZO : | Zona occludens-1 |

INTRODUCTION

PRÉFACE

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet ANR ICONS « Innovative Cerium Oxide Nanoparticles for Stroke » qui a pour but de développer une nouvelle stratégie thérapeutique reposant sur des nanoparticules d'oxyde de cérium (NPC) pour le traitement des accidents vasculaires cérébraux (AVC). Ce projet regroupe trois équipes de recherche académiques dont deux à la faculté de pharmacie de Paris de l'université Paris Descartes (EA4475, Pharmacologie de la circulation cérébrale puis UMR 1140 Innovations Thérapeutiques en Hémostase et U1022, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé), une à l'université Paris Diderot (UMR 7057, Matière et Systèmes complexes) ainsi qu'une entreprise : Specific Polymers (Castries, Montpellier).

Il existe deux types d'AVC : hémorragique (lié à la rupture d'un vaisseau sanguin cérébral) et ischémique (dû à l'occlusion d'un vaisseau sanguin cérébrale) ; ce dernier, largement majoritaire représente 80% de l'ensemble des AVC (Deb et al., 2010). Dans les pays occidentaux, l'AVC représente la 2^{ème} cause de mortalité, la 2^{ème} cause de démence et la première cause de handicap acquis chez l'adulte (Lozano et al., 2012; Murray et al., 2012; Béjot et al., 2016a; Béjot et al., 2016b). En France, l'incidence annuelle des AVC est de plus de 130 000 AVC, ce qui représente un AVC toutes les 4 minutes (Béjot et al., 2016). Du fait du vieillissement de la population, cette incidence risque d'augmenter ; en France, les projections indiquent que l'incidence des AVC augmentera de 50% d'ici 2030 (Béjot et al., 2016) et aura doublé en 40 ans, entre 1990 et 2030. Du point de vue curatif, un seul traitement pharmacologique est actuellement disponible pour les AVC ischémiques, un thrombolytique : l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant ou rt-PA. L'utilisation du rt-PA est cependant restreinte en raison d'une fenêtre thérapeutique étroite (dans les 4h30 suivant l'AVC) et de nombreuses contre-indications liées au risque hémorragique.

Dans ce contexte, il est important de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les AVC ischémiques. La physiopathologie de l'AVC ischémique met en jeu de nombreux mécanismes parmi lesquels un stress oxydant qui joue un rôle délétère prépondérant à la fois au niveau des neurones et des vaisseaux (Dirnagl et al., 1999; Sun et al., 2019)

Le stress oxydant survient lorsque les systèmes de défenses antioxydants sont submergés par la production d'espèces réactives (Sies, 2015; Sies et al. 2017; Sies, 2018); ces espèces provoquent

alors d'une part des dommages moléculaires (des protéines, des lipides, et des acides nucléiques) et d'autre part, activent différents facteurs de transcription et participent à la réaction inflammatoire post-ischémique (De Meyer et al., 2016). Ces phénomènes conduisent à la mort neuronale mais touchent également les vaisseaux. Le stress oxydant, *via* l'activation des métalloprotéinases de la matrice et la dégradation des protéines de jonction inter-endothéliales peut en effet conduire à l'ouverture de la barrière hématoencéphalique et induire des hémorragies cérébrales secondaires, encore appelées « transformations hémorragiques », qui constituent une des complications majeures des AVC ischémiques et un facteur de mauvais pronostic (Hacke et al., 2008; Kaesmacher et al., 2017). En outre, le rt-PA augmente le risque de transformations hémorragiques, notamment via une aggravation du stress oxydant. La réaction inflammatoire qui suit le stress oxydant est également un processus délétère qui se produit notamment à l'interface des cellules endothéliales et des vaisseaux sanguins (Adibhatla and Hatcher, 2008). L'inflammation entraîne notamment le recrutement et l'infiltration des leucocytes dans le parenchyme cérébral par l'intermédiaire des molécules d'adhérence cellulaire dont la protéine VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule), surexprimée suite à l'AVC ischémique (Cook-Mills et al., 2011). Ainsi, le rôle délétère du stress oxydant est clairement établi dans les lésions neuronales et vasculaires post-AVC.

De nombreuses stratégies antioxydantes ont été développées pour traiter les AVC (inhibition de la production de radicaux libres, capture des radicaux libres ou augmentation de leur dégradation ; Margaiil et al., 2005; Shirley et al., 2014; Li et Yang, 2016) et ont montré des effets neuroprotecteurs dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale. Malheureusement, toutes les stratégies qui ont ensuite fait l'objet d'études cliniques se sont révélées inefficaces. Malgré ces échecs, le stress oxydant reste une cible majeure pour le traitement des AVC, d'où la nécessité de développer de nouveaux systèmes pour le contrôler. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés au potentiel des nanoparticules d'oxyde de cérium (NPC) dont les capacités antioxydantes multiples venaient d'être décrites.

Les NPC présentent en effet des activités antioxydantes liées à leur composition et à leur structure (Khan et al., 2017) avec en particulier la présence d'ions Ce^{3+} et Ce^{4+} , et des places libres pour l'oxygène. Ainsi, les NPC peuvent piéger les radicaux libres (Xue et al., 2011; Dowding et al., 2012;

Dowding et al., 2013) et mimer l'activité d'enzymes antioxydantes (Baldim et al., 2018; Heckert et al., 2008; Pirmohamed et al., 2010) ; elles ont aussi la capacité de s'autorégénérer (Das et al., 2007; Perez et al., 2008). Au moment de démarrer cette thèse, seule une étude avait démontré l'efficacité des NPC dans un modèle d'ischémie cérébrale et notamment leur activité antioxydante et neuroprotectrice (Kim et al., 2012).

Le projet de cette thèse consiste non seulement à confirmer l'intérêt des NPC pour le traitement des AVC, mais surtout à optimiser leur potentiel grâce à deux stratégies. La première stratégie consiste à recouvrir les NPC de polymères innovants synthétisés par Specific Polymers, et ce afin d'améliorer leur propriétés pharmacocinétiques. La deuxième stratégie consiste à greffer sur les NPC un peptide reconnaissant VCAM-1 afin de cibler plus spécifiquement l'endothélium vasculaire et d'y concentrer l'activité antioxydante des NPC pour réduire la survenue des transformations hémorragiques.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

PREMIÈRE PARTIE : Les Accidents Vasculaires Cérébraux

1) Définitions

L'Accident Vasculaire Cérébral (AVC) est défini par l'OMS comme une « interruption de la circulation sanguine dans le cerveau, en général quand un vaisseau sanguin éclate ou est bloqué par un caillot (OMS | Accident vasculaire cérébral (AVC) consulté en 2019). L'apport en oxygène et en nutriments est stoppé, ce qui endommage les tissus cérébraux ». Pour compléter cette définition, il peut s'agir d'une interruption mais également d'une réduction significative de la circulation sanguine cérébrale. L'obstruction du vaisseau peut être induite par un thrombus local ou un embolie provenant de la circulation systémique (Hossmann, 2006). La réduction ou l'interruption de l'apport en oxygène et en nutriments induit un déficit brutal et spontané d'une fonction cérébrale focale ou globale.

Une définition actualisée de l'AVC est « un épisode aigu de dysfonctionnement du cerveau, de la rétine ou de la moelle épinière d'une durée supérieure à 24 heures, ou de toute durée si l'imagerie (CT ou IRM) ou l'autopsie montrent un infarctus ou une hémorragie en adéquation avec les symptômes » (Sacco et al., 2013).

2) Classification des AVC

Il existe deux types d'AVC, l'AVC hémorragique et l'AVC ischémique (Figure 1 ; Adams et al., 1993; Amarenco et al., 2009a, 2009b; Beal, 2010; Moskowitz et Iadecola 2010; Luengo-Fernandez et al., 2013).

2.1) L'AVC hémorragique

L'AVC hémorragique est dû à la rupture d'un vaisseau sanguin cérébral, il est minoritaire et représente 15-20% de l'ensemble des AVC (Escudero Augusto et al., 2008). La rupture du vaisseau sanguin peut être liée à différents facteurs tels que l'alcool, le tabac, la sédentarité, l'hypertension artérielle ou une malformation vasculaire. Ses effets néfastes résultent de l'hypoxie due à la

perturbation de l'approvisionnement vasculaire, de l'effet délétère du sang libéré dans le parenchyme cérébral, ainsi que de l'augmentation de la pression intracrânienne (ICP) en raison d'un saignement continu.

Il existe deux sous types d'AVC hémorragique : l'hémorragie intracérébrale (qui survient généralement dans les petites artères ou artérioles) et l'hémorragie sous-arachnoïdienne (due le plus souvent à une rupture d'anévrisme d'un vaisseau à la base du cerveau ou à un saignement lié à des malformations vasculaires proches de la surface piaie).

2.2) L'AVC ischémique

L'AVC Ischémique est dû à l'occlusion partielle ou totale d'un vaisseau sanguin cérébral par un caillot, il est largement majoritaire car il représente 80 à 85% de l'ensemble des AVC (Hatano, 1976; Adams et al., 1993; Deb et Hassan, 2010). L'occlusion du vaisseau sanguin induit une réduction de la perfusion cérébrale et provoque une diminution des apports en oxygène et en glucose induisant une déplétion énergétique et une cascade physiopathologique délétère.

La classification TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment), utilisée dans la plupart des études cliniques, regroupe les principaux types d'AVC ischémique selon leur étiologie (Adams et al., 1993, 1997; Goldstein et al., 2001; Chung et al., 2014):

- Athérosclérose (50% des cas) : Dépôt d'une plaque (athérome) sur la paroi des artères. Ces plaques peuvent diminuer le diamètre interne du vaisseau voire l'obstruer totalement ou provoquer des lésions artérielles (sclérose).
- Micro-angiopathie (25% des cas) : Affection des vaisseaux sanguins de petit calibre
- Embolie (20% des cas) : Embole/ Caillot, principalement d'origine cardiaque
- Vascularite, affection hématologique, coagulopathie ou origine indéterminée (< 5%)

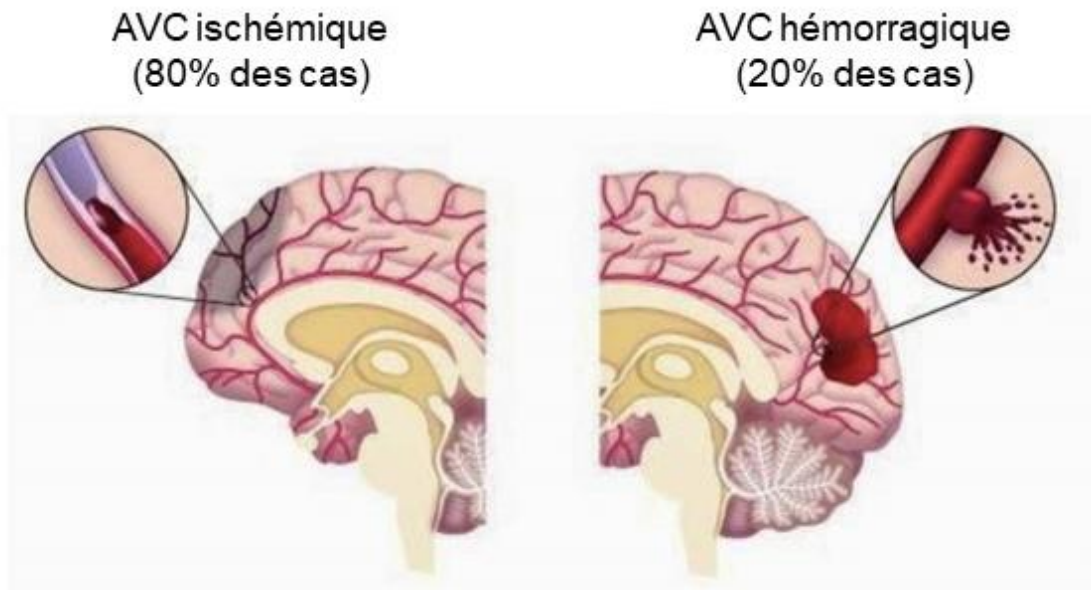


Figure 1 : Représentation des différentes formes de l'accident vasculaire cérébral (AVC).

A gauche les AVC ischémiques (80% des cas d'AVC) dû à l'occlusion d'une artère cérébrale et à droite l'AVC hémorragique (20% des cas) qui est dû à la rupture d'une artère cérébrale. D'après Bras, C - AVC ischémique ou hémorragique ?.

Enfin, l'Accident Ischémique Transitoire (AIT) ou Ischémie Cérébrale Transitoire (ICT) est défini comme une dysfonction cérébrale durant moins de 24 heures et sans preuve de l'infarctus à l'imagerie (Sacco et al., 2013).

3) Epidémiologie

En 2010, la prévalence de l'AVC est estimée à 33 millions (+ 84 % par rapport à 1990), son incidence à 16,9 millions de nouveaux cas soit 258/100 000 personnes (+ 68 % par rapport à 1990) et le nombre de morts s'élevait à 5,9 millions (+ 26 % par rapport à 1990 ; Feigin et al., 2014, 2016; Hankey, 2017).

Dans le monde, l'AVC représente ainsi la 2^{ème} cause de mortalité derrière les cardiopathies ischémiques, ces deux pathologies ayant été responsables de 15,2 millions de décès en 2016 (Bakhai, 2004; Di Carlo, 2009; Heron, 2011; Lozano et al., 2012; « OMS | Les 10 principales causes de mortalité » ; Figure 2). Les principales causes de mortalité varient en fait en fonction du développement des pays, ainsi les AVC représentent la 3^{ème} cause de mortalité dans les économies à bas revenu (49,6 décès/ 100 000 habitants) et la 2^{ème} pour les économies à revenu moyen (94,9/ 100 000) et les économies à revenu élevé (64,7/ 100 000 ; « OMS | Les 10 principales causes de

mortalité »). L'AVC est également la première cause de handicap acquis chez l'adulte (Murray et al., 2012).

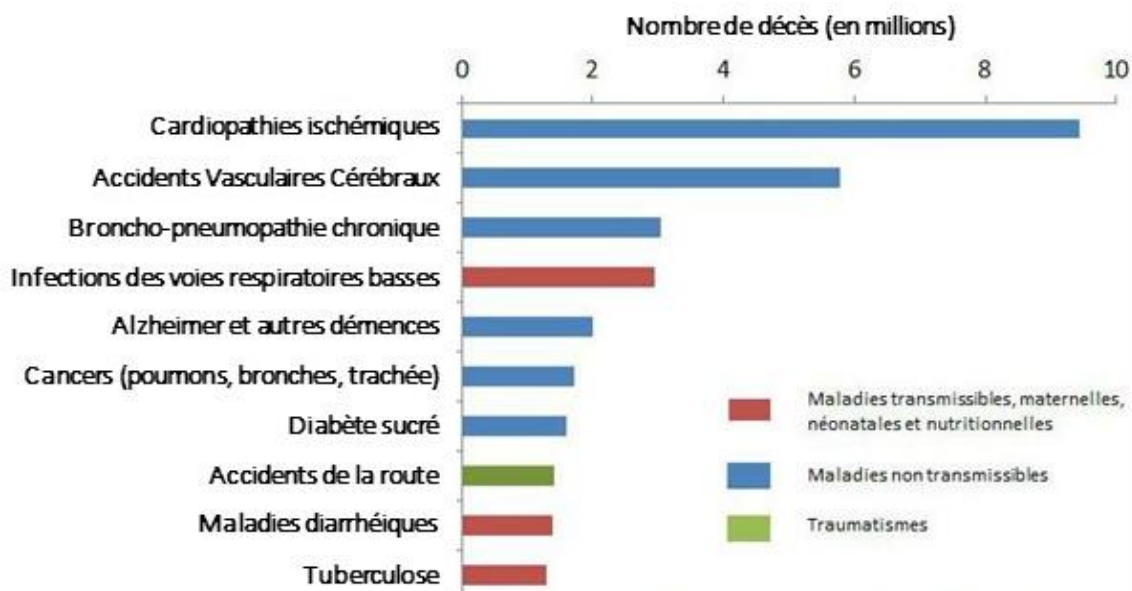


Figure 2 : Les 10 principales causes de mortalité en 2016.

Représentation des 10 principales causes de mortalité selon l'OMS en 2016. L'échelle de 0 à 10 est en Millions de décès dans l'année. Un code de 3 couleurs est utilisé pour différencier les maladies non transmissibles (en bleu), les maladies transmissibles (en rouge) et les traumatismes (en vert). D'après l'« OMS | Les 10 principales causes de mortalité ».

En France, l'incidence annuelle des AVC est de 1,6 à 2,4 pour 1 000 personnes soit plus de 130 000 AVC par an, et un AVC toutes les quatre minutes (à titre de comparaison, aux États-Unis, il se produit en moyenne un AVC toutes les 40 secondes conduisant à un décès toutes les 4 minutes (Lloyd-Jones et al., 2009; Benjamin et al., 2018)). De plus, l'AVC est la première cause de mortalité chez les femmes, en partie en raison de leur espérance de vie plus importante (Persky et McCullough 2010; Meirhaeghe et al., 2018; Fraticelli et al., 2019). L'AVC représente la 1^{ère} cause de handicap acquis chez l'adulte, la 2^{ème} cause de démence (après la maladie d'Alzheimer) et la 2^{ème} cause de décès (environ 10 % ; Bakhai, 2004; Béjot et al., 2016a; Béjot et al., 2016b; Di Carlo 2009; Heron, 2011; « Inserm |Accident vasculaire cérébral (AVC) »).

Du fait du vieillissement de la population, l'incidence des AVC risque d'augmenter. En France, les projections indiquent que l'incidence des AVC augmentera de 50% d'ici 2030 (Figure 3 ; Béjot et al., 2016a; Béjot et al., 2016b) et l'incidence aura doublé en 40 ans, entre 1990 et 2030. De plus, le

nombre d'hospitalisation pour AVC a augmenté de 21% entre 2000 et 2006 en France (Béjot et al. 2016).

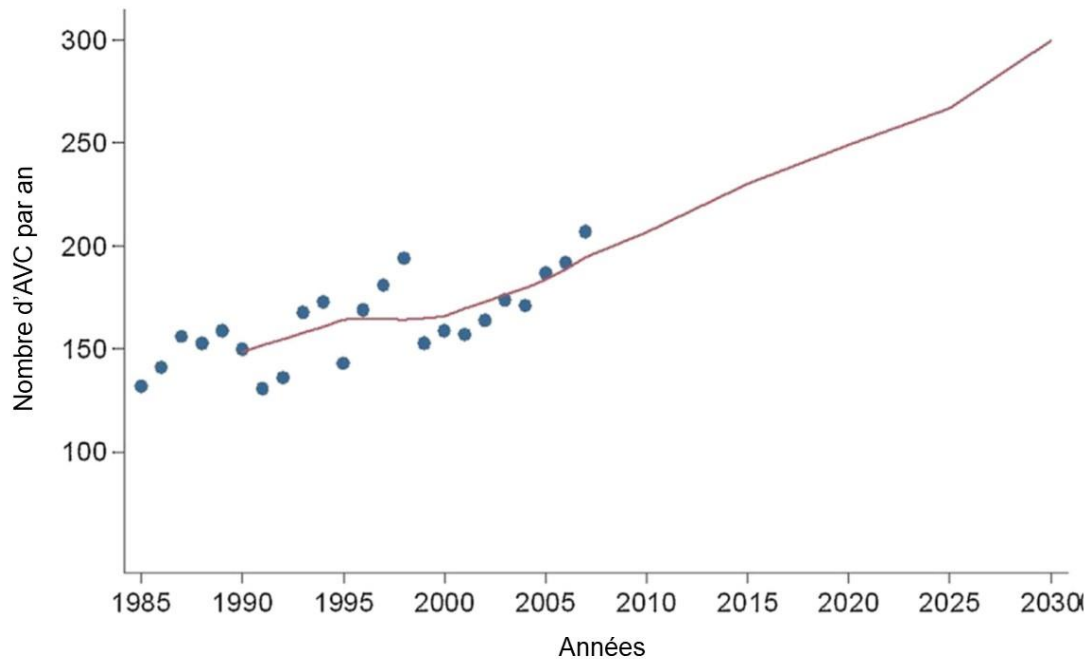


Figure 3 : Nombre d'AVC annuel enregistré à Dijon et projection jusqu'en 2030.

La projection indique que le nombre d'AVC augmentera de 50% d'ici 2030. D'après Béjot et al. 2016.

L'AVC représente un enjeu majeur de santé publique, avec d'importantes implications cliniques, sociales et économiques. La compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents est primordiale afin d'adopter des mesures préventives appropriées ainsi que des thérapies efficaces. En effet, 75 % des personnes ayant subi un AVC garderont des séquelles définitives dont 30 % de dépendance. La capacité de travail est en effet compromise chez 70 % des victimes d'AVC, dont 25 % ne reprendra jamais d'activité professionnelle ; 25 à 50 % des patients souffriront de dépression au cours de la première année. Ainsi, le coût des AVC aux États-Unis était estimé à 73,7 milliards de dollars en 2010, et devrait se chiffrer à 1 520 milliards en 2050 (Pinoit et al., 2006; Lloyd-Jones et al., 2009). En France, le coût des soins des patients s'élevait de 5,6 à 8,6 milliards d'euros en 2007 (Chevreul et al., 2013; de Pourville, 2016).

4) Facteurs de risques

Les facteurs de risques peuvent être modifiables ou non modifiables, les premiers ayant un enjeu tout particulier car les campagnes de santé publique et leur prévention permettraient de réduire l'incidence de l'AVC. En effet, les dix facteurs de risques modifiables les plus importants représentent environ 90% du risque d'AVC (Feigin et al., 2016; O'Donnell et al., 2016; Béjot et al., 2016).

L'hypertension (**facteur de risque modifiable** le plus important), l'hypercholestérolémie, la sténose carotidienne, la fibrillation auriculaire sont connues pour être des facteurs de risque de l'AVC ; en effet les essais cliniques ont démontré que les traitements de ces pathologies réduisaient l'incidence de l'AVC. (Hart et al., 2007; Raman et al., 2013; Xie et al., 2016; Collins et al., 2016). Le tabagisme, la consommation excessive d'alcool et l'hyperglycémie sont également des facteurs de risques probables (Peters et al., 2014; Chi Zhang et al., 2014; Mons et al., 2015; Kernan et al., 2016).

L'âge représente **le facteur de risque non modifiable** le plus important, à partir de 55 ans le taux d'AVC double tous les 10 ans et 80 % des AVC se produisent chez les personnes de plus de 65 ans (Goldstein et al., 2006, 2011).

Parmi les autres facteurs de risque des AVC, on peut citer la pollution atmosphérique, la condition physique, l'alimentation, l'inactivité physique, l'obésité, la variabilité de pression artérielle, les troubles respiratoires du sommeil, l'inflammation chronique, les infections, les maladies rénales chroniques, la migraine, la contraception hormonale, le stress psychosocial et professionnel, la dépression, la prise d'amphétamines, les longues heures de travail (Guiraud et al., 2010; O'Donnell et al., 2016; Feigin et al., 2016).

L'inflammation est également un facteur de risque des AVC ; en effet il a été rapporté que l'inflammation chronique avec des taux élevés de protéine C-réactive (CRP) est un facteur de risque des AVC ou AIT (Di Napoli et al. 1999, 2001). L'AVC est associé à un large éventail de conditions inflammatoires systémiques (vascularite primaire, artérite, polyarthrite rhumatoïde, sclérodermie progressive, sarcoïdose ou encore maladie inflammatoire de l'intestin). Les maladies infectieuses aiguës ont également un impact sur la survenue et la sévérité des AVC. Le plus souvent, elles sont d'origine respiratoire et bactérienne, et provoquent un déficit neurologique plus important que chez les patients sans infection (Campbell et al., 2000; Grau et al., 2001).

5) Symptômes et Diagnostic

Les symptômes les plus courants de l'AVC sont une faiblesse subite, une perte de la sensibilité de la face et/ ou d'un membre, la plupart du temps d'un seul côté du corps, entraînant une paralysie d'une partie du visage, des difficultés d'élocution (dysarthrie), des troubles de la prononciation et une incapacité à déplacer un membre.

Les autres symptômes sont la confusion mentale, des troubles de la compréhension, des troubles de l'élocution, la baisse de la vision unilatérale ou double, la diplopie, la difficulté à marcher, des vertiges isolés ou non orthostatiques, la perte de l'équilibre ou de la coordination (ataxie), l'hémiballisme, la dysphagie, des céphalées sévères inhabituelles, l'évanouissement, l'amnésie, l'anosognosie, une altération de la conscience ou l'inconscience (Hankey and Blacker, 2015, 2019).

Pour le diagnostic, des campagnes de sensibilisation sont réalisées avec l'acronyme « VITE » pour Visage paralysé - Incapacité/ Impossibilité de bouger un membre - Trouble de la parole - Extrême urgence (Figure 3). Il provient d'une adaptation de l'acronyme anglais « FAST » pour Face (Visage), Arm (Bras), Speech (Parole), Time (Temps ; Figure 3). Ces campagnes facilitent le dépistage des AVC et sont aussi sensibles et spécifiques que le score de reconnaissance des AVC (ROSIER : Recognition Of Stroke In the Emergency Room ; Whiteley et al., 2011; Hankey et Blacker, 2015). Le score ROSIER s'étend de -2 (AVC improbable) à +5 (AVC probable), il comprend 7 paramètres et prend en compte l'historique clinique (Perte de connaissance et épilepsie) et les signes cliniques (asymétrie faciale, faiblesse des membres, atteinte du champ visuel...)



Figure 4 : Campagne de sensibilisation au dépistage de l'AVC.

Ces figures sont issues des campagnes française et anglaise de sensibilisation au dépistage de l'AVC. Les acronymes VITE et FAST sont utilisés pour décrire les différents symptômes durant un AVC : Paralysie/affaissement du visage (Visage - Face), Incapacité à lever un bras, faiblesse dans un bras (Incapacité - Arms), Difficulté/trouble de l'élocution, la parole, la prononciation (Trouble de la Parole - Speech) et Extrême urgence (Time). D'après « France AVC », « Stroke Association ».

Un diagnostic précoce de l'AVC est extrêmement important car une partie du parenchyme cérébral en détresse peut être sauvée si le patient est traité rapidement. Cela renvoie au concept « Time is Brain » décrit en 2006 par Saver sur la base des pertes estimées de différents constituants cérébraux (Saver, 2006; Lyden, 2008; Khatri et al., 2014) – Figure 4). Une recanalisation précoce du vaisseau occlus permettrait de sauver les cellules neuronales et gliales de la pénombre mais également certaines cellules gliales de la zone ischémique centrale, limitant ainsi nettement la taille du tissu lésé (Turner et Vink, 2007).

Tableau I : Perte cérébrale en fonction du temps après un AVC. D'après Saver 2006.

| Pertes | Par Seconde | Par Minute | Par Heure |
|---------------------------------------|-------------|----------------|-----------------|
| Neurones | 32 000 | 1 900 000 | 120 000 000 |
| Synapses | 230 000 000 | 14 000 000 000 | 830 000 000 000 |
| Fibres myélinisées | 200 m | 12 km | 714 km |
| Accélération du vieillissement | 8h42 | 21 jours | 3 ans et 7 mois |



En dehors des symptômes, le diagnostic d'AVC repose sur l'imagerie. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) pondérée en diffusion (DWI-MRI) détecte une ischémie cérébrale aiguë dans environ 90% des cas pour les patients atteints d'un AVC ischémique et environ 30% des patients présentant des symptômes transitoires jusqu'à 24 heures. Parallèlement, la tomodensitométrie crânienne sans contraste présente une sensibilité quasi parfaite pour détecter les hémorragies intracrâniennes récentes mais sa sensibilité au diagnostic des AVC ischémiques est faible notamment si l'ischémie est récente, faible ou dans la fosse cérébrale postérieure (Brazzelli et al., 2009; Brunser et al., 2013; Brazzelli et al., 2014). Enfin, les séquences IRM en écho de gradient T2* pondérée sont aussi sensibles que la tomodensitométrie crânienne sans contraste pour les hémorragies aiguës et plus sensibles pour les hémorragies antérieures. L'œdème cérébral peut également être détecté par IRM ou tomodensitométrie. Le diagnostic de l'AVC est difficile dans les premières heures, particulièrement si le début est incertain, les caractéristiques atypiques ou changeantes, le patient malade ou agité et si l'accès à l'imagerie est retardé ou l'imagerie cérébrale normale.

6) Pronostic après les AVC et AIT

Le taux de mortalité suite à l'ensemble des AVC est d'environ 15% à 1 mois, 25% à 1 an et 50% à 5 ans (Luengo-Fernandez et al., 2013a; Luengo-Fernandez et al., 2013b; Luengo-Fernandez et al., 2013c). Après une hémorragie intracérébrale, le taux de mortalité est d'environ 55% à 1 an et de 70% à 5 ans (Poon et al., 2014). De plus, 20% des survivants d'un AVC présentent un handicap (Echelle de Rankin modifiée [mRS], score de 3 à 5), et environ 40% entre 1 mois et 5 ans après la survenue de l'AVC (Luengo-Fernandez et al., 2013a; Luengo-Fernandez et al., 2013b; Luengo-Fernandez et al., 2013c). Cinq variables (âge, composante verbale de l'échelle de Glasgow [GCS], puissance du bras, capacité à marcher et dépendance avant un AVC) permettent de prédire le niveau de dépendance entre 3 et 12 mois après l'AVC (Ayis et al., 2013). Parmi les autres facteurs pronostiques, nous pouvons citer la gravité de l'AVC, le sous type clinique, le statut professionnel, l'état matrimonial et les AVC récurrents (Luengo-Fernandez et al., 2013a; Luengo-Fernandez et al., 2013b; Luengo-Fernandez et al., 2013c).

Après un AVC ischémique ou un AIT, le risque d'AVC récurrent sans traitement est d'environ 10 % à une semaine, 15 % à un mois et 18 % à 3 mois (Coull et al., 2004). Le risque est plus important chez les individus présentant une athérosclérose symptomatique récente, et des scores élevés du prédicteur ABCD³-I (Age, Blood Pressure [Pression artérielle], Clinical Features [Caractéristiques cliniques], Durations of Symptoms [Durée des symptômes], Diabète, Dual TIA [≥ 1 autre TIA dans les 7 jours précédent], Imaging [Imagerie] ; Kiyohara et al., 2014; Arsava et al., 2016). L'ancien score ABCD² ne discriminait pas de manière fiable les patients à risque faible ou élevé (Amarenco et al., 2012; Wardlaw et al., 2015). Le risque d'AVC récurrent est diminué de 80% en cas de prise en charge urgente et de traitement approprié (Rothwell et al., 2007; Amarenco et al., 2011, 2016).

Le risque à long terme de la récurrence de l'AVC est de 1 à 4 % à 1 mois, 10 % à un an, 25 % à 5 ans et 40 % à 10 ans (Mohan et al., 2011; Y. Béjot et al., 2016). Ce risque est plus élevé chez les personnes présentant une pathologie athérosclérotique symptomatique, des facteurs de risque vasculaires, une source active de thrombose, ou chez celles qui ont cessé de prendre leur traitement antiplaquettaire ou antihypertenseur. Pour les patients atteints de fibrillation auriculaire, le risque d'AVC augmente avec des valeurs plus élevées de score de risque embolique tel que les scores CHADS₂ (insuffisance Cardiaque congestive, Hypertension, Âge > 75ans, Diabète, Antécédent AVC), CHA₂DS₂-VASc (+ maladie Vasculaire, Age 65-74 ans, Sexe féminin), ABCD (Age, Pression Artérielle, Clinique, Durée) ainsi que les antécédents cliniques (Hijazi et al., 2016).

Après un AVC hémorragique, les risques annuels d'hémorragie intracérébrale récurrente et d'AVC ischémique sont similaires et varient de 1,3 % à 7,4 % (Poon et al., 2014). Le risque d'hémorragie intracérébrale récidivante est plus élevé après une hémorragie intracérébrale lobaire qu'après une hémorragie non lobaire, et chez les patients dont le contrôle de la pression artérielle est insuffisant par rapport à ceux chez lesquels la pression artérielle est maintenue dans des limites prédéterminées (Biffi et al., 2015).

7) Physiopathologie des AVC ischémiques

Le cerveau est un des organes le plus dépendant en apport énergétique. En effet, alors qu'il ne représente que 2% de la masse du corps humain, le cerveau participe à hauteur de 20 à 25% de sa consommation énergétique (Edvinsson et al., 2002), dont 20% de la consommation d'O₂ et 2% de celle en glucose ; pour sa production d'énergie, le cerveau dépend principalement de la phosphorylation oxydative (Aarts et Tymianski, 2005; Herculano-Houzel, 2011; Watts et al., 2018). Le cerveau est donc très sensible aux variations de débit sanguin cérébral (DSC).

Le DSC physiologique est de 50mL à 60mL/min/100g de tissu cérébral chez l'adulte, ce débit pouvant varier en fonction de l'âge, de l'état de santé et de l'activité cérébrale. Un AVC ischémique peut se manifester sous la forme d'un AVC thrombotique (gros ou petit vaisseau), d'un AVC embolique (avec ou sans facteur cardiaque ou artériel connu), d'une hypoperfusion systémique ou d'une thrombose veineuse (Amarenco et al., 2009a, 2009b). Indépendamment de la cause, l'évènement principal est la diminution de l'approvisionnement vasculaire cérébral dans la majorité des cas d'AVC aigus (85 à 90%). La faible réserve énergétique et une dépendance totale au métabolisme aérobie rendent le tissu cérébral particulièrement vulnérable aux effets de l'ischémie (Pauwels et al., 1985).

La plupart des accidents ischémiques ne provoque pas de réduction complète de l'apport sanguin. Toutefois une occlusion partielle pendant une période prolongée peut avoir des effets néfastes en raison de la détérioration du gradient ionique et des produits du métabolisme anaérobie tels que l'acide lactique ou les protons (Karaszewski et al., 2009). L'AVC, qu'il soit transitoire ou permanent, entraîne une série complexe d'évènements physiopathologiques qui évoluent dans le temps et l'espace, provoquant une lésion cérébrale. L'étendue des dommages dépend généralement de la durée, de la sévérité et de la localisation de l'ischémie.

7.1) Physiopathologie spatiale de l'AVC :

Il existe deux régions cérébrales au cours des AVC : le cœur et la pénombre (Kaufmann et al., 1999; Bandera et al., 2006; Yu et al., 2016; Catanese et al., 2017 ; Figure 5) :

- **Le cœur de l'AVC** est la zone où la chute de DSC est la plus marquée (supérieure à 75% ; Astrup et al., 1977). Dans cette région, la déplétion énergétique et le stress métabolique sont tels qu'ils provoquent une nécrose des tissus en quelques minutes en raison d'une insuffisance d'ATP qui permet normalement de maintenir les gradients ioniques et métaboliques (Astrup et al., 1977; Jones et al., 1981). Le cœur de l'AVC évolue et se propage dans le temps et l'espace : les régions ayant un DSC inférieur à 15 mL/min/100g pendant 6h et de 20 mL/min/ 100g pendant 24h après le début de l'AVC en font partie.
- **La zone de pénombre** est définie comme la région où la chute du débit sanguin cérébral est plus modérée : entre 10 et 20 mL/min/100g (Astrup et al., 1977), ce qui conduit à une altération du métabolisme tissulaire (Baron, 1999 ; Jung et al., 2013). La pénombre est caractérisée par un potentiel membranaire cellulaire normal mais par une perturbation de la capacité à déclencher un potentiel d'action normal, rendant l'activité électrique nulle à l'électroencéphalogramme. La pénombre est une zone à risque dont les atteintes sont réversibles à condition que le flux sanguin y soit rétabli rapidement (Moskowitz et al., 2010). Si le flux n'est pas rétabli, les cellules des tissus initialement dans la pénombre progressent vers la mort cellulaire, aboutissant finalement à une augmentation du cœur de l'AVC (Lo, 2008).

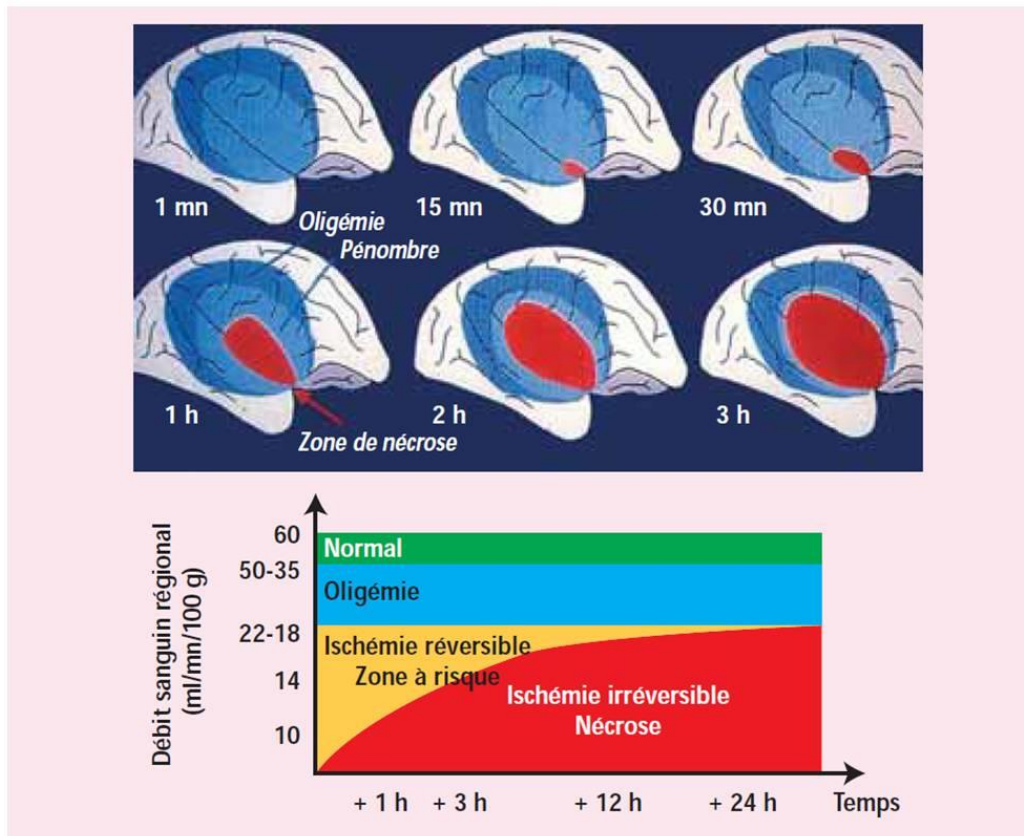


Figure 5 : Représentation schématique de l'évolution de la pénombre et du cœur de l'AVC.
D'après Baron, 1999.

7.2) Physiopathologie temporelle de l'AVC :

L'AVC induit de nombreux mécanismes physiopathologiques qui évoluent au cours du temps. L'épuisement local en oxygène et en glucose entraîne une défaillance de la production d'adénosine triphosphate (ATP), dont les « réserves » sont consommées dans les 2 minutes. Cela affecte négativement les processus dépendants de l'énergie tels que l'homéostasie ionique, nécessaire à la survie des cellules (Murphy et al., 2008). Une série d'événements interdépendants est alors déclenchée parmi lesquels l'excitotoxicité, le stress oxydant et l'inflammation jouent un rôle majeur (Figure 6 ; Dirnagl et al., 1999; Lo, 2008; Ostrowski et al., 2006; Besancon et al., 2008; Rama et García, 2016; Ouyang et al., 2007; Moustafa et Baron, 2008; Sun et al., 2019)

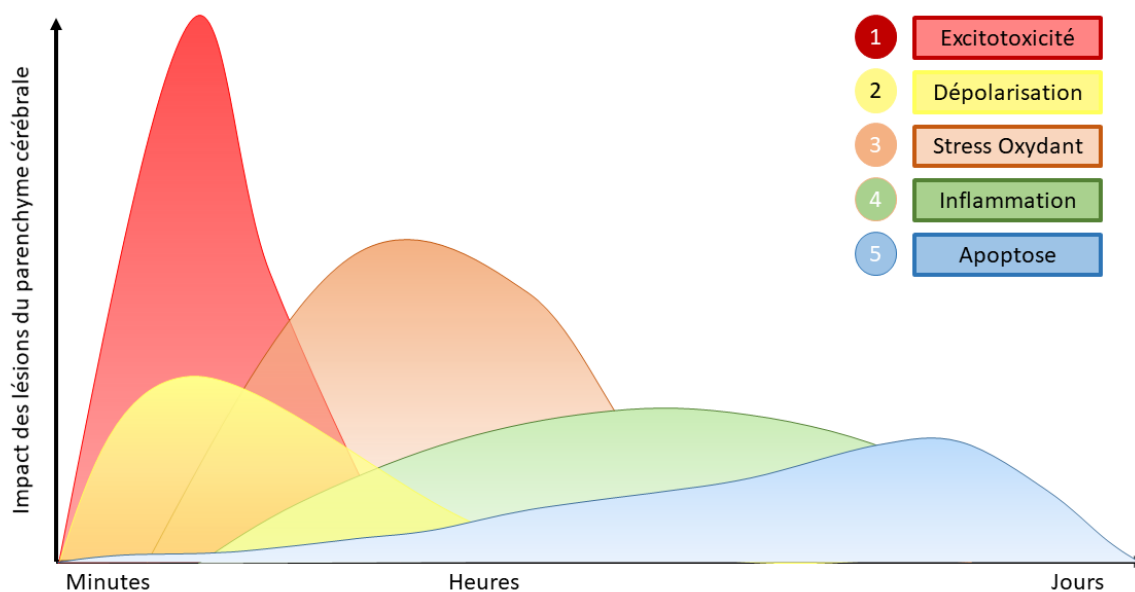


Figure 6 : Représentation des mécanismes lésionnels après un AVC.

Cette figure montre les différents mécanismes physiopathologiques déclenchés après un AVC : l'axe des abscisses représente la temporalité des différents mécanismes, l'axe des ordonnées représente l'impact de ces mécanismes sur les lésions cérébrales. D'après Dirnagl et al., 1999.

8) Traitements spécifiques de l'AVC ischémique aigu

L'un des objectifs après un AVC ischémique est de rétablir la perfusion sanguine cérébrale. La thrombolyse par l'alteplase (Activateur tissulaire du plasminogène recombinant recombinant- ou rt-PA) est longtemps restée la seule option pour détruire le thrombus responsable de l'ischémie. Aujourd'hui, à côté de cette approche pharmacologique, des dispositifs permettant le retrait mécanique du caillot (ou thrombectomie) ont été développés.

8.1) La thrombolyse

8.1.1) Données cliniques de la thrombolyse

Le premier essai clinique montrant l'efficacité du rt-PA pour le traitement des AVC ischémiques a été réalisé en 1995 par le « National Institute of Neurological Disorders and Stroke » (NINDS, 1995) ; il a conduit à l'autorisation de mise sur le marché (AMM) du rtPA par la FDA (Food and Drug Administration) en 1996 (Adams et al., 1996; Lyden et al., 1997). Le rt-PA devait alors être administré à la dose de 0,9mg/kg par voie intraveineuse, dans les 3 heures suivant l'AVC ischémique (injection

de 10% de la dose en bolus et des 90% restants en perfusion sur 1 heure ; Del Zoppo et al., 2009; Fonarow et al., 2014; Fisher et Saver, 2015; Thiebaut et al., 2018; Lyden, 2019). D'autres essais cliniques ont suivi, notamment européens, ECASS¹ I (Hacke et al., 2008) et ECASS II (Hacke et al., 1998; Hacke et al., 1999; Lees, 1999) suivis par l'AMM européenne délivrée par l'agence européenne des médicaments en 2002 et finalement ECASS III qui a permis d'allonger la fenêtre thérapeutique du rt-PA de 3h à 4h30 (Hacke et al., 2008). L'essai IST-3² a permis de montrer des effets bénéfiques chez certains patients avec un traitement démarré 6h après le début de l'AVC (Whiteley et al., 2006). Des études plus récentes ont mis en évidence un effet bénéfique du rt-PA avec une fenêtre thérapeutique encore plus étendue, de 6h (Lyden, 2019) à 9h après l'AVC (Ma et al., 2019). Actuellement, le rt-PA reste le traitement utilisé pour traiter les AVC ischémiques jusqu'à 4h30 après le début des symptômes (Thiebaut et al., 2018; Powers et al., 2018; Thomalla et al., 2018). Il diminue de 30% la probabilité de développer un handicap significatif (mRS 0 – 1) entre 3 et 6 mois et ses bénéfices sont plus importants lors d'une administration précoce (Emberson et al., 2014). Une méta-analyse sur 6 756 patients (9 essais randomisés) publiée en 2014 comparant la thrombolyse par le rt-PA versus placebo a confirmé que la thrombolyse administrée dans les 4h30 après le début des symptômes améliore significativement le pronostic fonctionnel (Emberson et al., 2014). L'alteplase n'affecte pas la mortalité malgré l'augmentation du risque d'hémorragie intracérébrale symptomatique (Emberson et al., 2014).

A ce jour, 27 essais cliniques ont été réalisés avec des thrombolytiques dans l'AVC ischémique (Wardlaw et al., 2014; Thiebaut et al., 2018) : 12 avec le rt-PA, 6 avec l'urokinase, 4 avec la streptokinase, 3 avec la desmoteplase et 2 avec la pro-urokinase (Thiebaut et al., 2018). Les essais cliniques sur l'alteplase ont confirmé ses bénéfices comparés au placebo (Al-Ajlan et al., 2016; Moussaddy et al., 2018). Le tenecteplase (Appendix), qui possède une demi-vie plus longue, une meilleure spécificité pour la fibrine, et une meilleure résistance à l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène est actuellement comparé à l'alteplase dans plusieurs essais cliniques de phase 3 (Huang et al., 2016) : un essai clinique sur 202 patients a démontré une amélioration du résultat fonctionnel à 90 jours (score modifié de Rankin de 2 *versus* 3) après administration du tenecteplase par rapport à l'alteplase (Campbell et al., 2018) tandis qu'un autre sur 1107 patients n'a démontré aucune amélioration (Logallo et al., 2017). Les résultats fonctionnels n'ont pas été améliorés par le desmoteplase (Albers et al., 2015). Les médicaments antithrombotiques concomitants tel que l'aspirine doivent être évités dans les premières 24 heures après l'alteplase afin de limiter le risque de TH (Zinkstok, et ARTIS investigators 2012).

¹ ECASS : European cooperative acute stroke study

² IST-3 : Third International Stroke Trial

8.1.2) L'efficacité limitée du rt-PA

Chez les patients arrivés dans les délais pour une thrombolyse par le rt-PA, celle-ci n'est pas toujours efficace. En effet, seulement 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 aucune recanalisation n'est observée pour 22 à 41% des patients (Alexandrov et al., 2000; Bhatia et al., 2010; Christou et al., 2000; Rubiera et al., 2005). Ce taux de recanalisation varie en fonction de la voie d'administration : 46,2% par administration intraveineuse et 63,2% en administration intra-artérielle (Pandian, 2009). En plus de ce manque d'efficacité, le rt-PA peut être à l'origine d'une toxicité vasculaire.

8.1.3) Toxicité vasculaire du rt-PA

L'ischémie cérébrale entraîne non seulement des pertes neuronales, mais également des lésions vasculaires pouvant conduire à des hémorragies intracérébrales post-ischémiques encore appelées « **transformations hémorragiques** » ou TH. L'incidence des TH dépend de l'utilisation d'agent thrombotique et la voie d'administration, le délai de prise en charge mais également de nombreux autres facteurs tels que l'âge, la glycémie, la sévérité de l'AVC, la pression sanguine, la prise d'anticoagulant ou d'antiplaquettaire (Jaillard et al., 1999; Kidwell et al., 2002; The NINDS T-PA Stroke Study Group, 1997; Marsh et al., 2016).

L'incidence des TH spontanées ou induites par le rt-PA est très variable selon les études et les méta-analyses (Stone et al., 2017) comme le souligne le tableau II. La plupart des essais cliniques concernant les thrombolytiques rapportent des incidences de 0,6 à 7%, mais cela est probablement sous estimé dû à l'utilisation de critères d'inclusion plus stricts (Tan et al., 2014; Hacke et al., 2004; Lansberg et al., 2007).

Tableau II : Incidence des transformations hémorragiques spontanées ou induites par le rt-PA dans différentes études et méta-analyses (méta-analyses en gras).

| Référence | Cohorte | Spontanée | Rt-PA | Augmentation |
|------------------------|--------------|-----------|-------|--------------|
| Valentino et al., 2017 | 119 patients | 5,9% | | |
| Tan et al., 2014 | 407 patients | 4,5% | | |
| NINDS Group, 1995 | 624 patients | 0,6% | 6,4% | 10,6 |

| | | | | |
|----------------------------|--|------|----------------------------------|-----|
| Thomalla et al., 2018 | 503 patients | 4,9% | 8% | 1,6 |
| Sussman and Connolly, 2013 | 18 essais cliniques – 11 000 patients | - | 2,4 – 8,8% (IV) 10 – 15% (IA) | |
| Wardlaw, 2001 | 27 essais cliniques – 10 239 patients | | | 4 |
| Lindley et al., 2004 | 28 études et 19 essais cliniques | 8,5% | - | |
| Seet and Rabinstein, 2012 | 7 essais cliniques, 7 registres et 10 études de cohorte | | 3,3 – 7,6% | |
| Emberson et al., 2014 | 9 essais cliniques – 6 756 patients | 1,3% | 6,8% | 5,2 |

D'après le tableau, le taux de TH spontanée varie de 0,6% à 8,5% et le taux de TH après traitement par le rt-PA varie de 2,4 à 15%. Dans toutes les études, le traitement par le rt-PA augmentait le risque de TH, d'un facteur 1,6 à 10.

Une méta-analyse a relevé le taux de TH symptomatique en fonction des différents types de traitements : de 2,4 à 8,8% par fibrinolyse par IV, 10 à 15,4% par fibrinolyse par IA, 6,2 à 23,5% lors d'une fibrinolyse par IV et IA, et 0 à 11,2% lors d'une thrombectomie mécanique (Sussman and Connolly, 2013).

Les risques d'hémorragie intracérébrale symptomatique avec l'alteplase sont plus importants chez les patients avec un score SEDAN³ élevé (Emberson et al., 2014; Strbian et al., 2014). Le score SEDAN peut en effet prédire le risque d'hémorragie intracérébrale symptomatique : 1,6% de risque pour un score de 0 et 16,9% pour le score maximal de 6.

L'utilisation d'une dose plus faible d'Alteplase (0,6 mg/ kg) réduit l'incidence des hémorragies intracérébrales symptomatiques mais n'améliore pas le résultat fonctionnel à 90 jours par rapport à

³ SEDAN : **S**ugar - Glycémie, - **E**arly Infact signs - signes d'infarctus précoce, **D**ense cerebral artery signe d'artère cérébrale bouchée, **A**ge et score **NIHSS** [National Institutes of Health Stroke Scale]. Le Score NIHSS est une évaluation sur 15 critères qui permet de prédire la sévérité de l'AVC.

la dose standard (Anderson et al., 2016). Plusieurs études ont rapporté une augmentation du nombre de décès à 90 jours après traitement par le rt-PA (Ma et al., 2019; Thomalla et al., 2018).

Au niveau vasculaire, le rt-PA est impliqué dans l'altération de la BHE induisant des TH (Wang et al., 2015; Suzuki et al., 2016; Turner et Sharp, 2016; Kanazawa et al., 2017); il active en effet les **métalloprotéases de la matrice** (MMP), responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire et des protéines de jonctions endothéliales telles que l'occludine ou les claudines (Yang et al., 2007; Liu et al., 2012; Wang et al., 2015; Turner et Sharp, 2016; Lakhan et al., 2013). Les taux de MMP-9 corrélerent à un risque accru de TH (Montaner et al., 2001, 2003; Rosell et al., 2008). D'un point de vue expérimental, il a été montré qu'une inhibition pharmacologique ou génétique de la MMP-9 entraîne une réduction significative du risque de complications hémorragiques (Asahi et al., 2001; Sumii et Lo, 2002; Lapchak et Maher, 2011). D'autres études ont démontré que l'hémorragie et l'œdème associés au rt-PA semblaient être corrélés à une dérégulation de la MMP-9 (Wang et al., 2003; Tsuji et al., 2005). Enfin, dans les zones lésées ayant subi une hémorragie, il a été rapporté une forte infiltration de neutrophiles avec une teneur locale élevée en MMP-9, étroitement liée à la dégradation de la lame basale et aux lésions de la BHE.

Le rt-PA exacerbe également la réponse **pro-inflammatoire** *via* l'activation de la microglie par le récepteur LRP et l'annexine II (Siao et Tsirka, 2002; Zhang et al., 2009). De plus, le rt-PA favorise l'expression des molécules d'adhérence telles qu'ICAM-1, potentialisant l'infiltration leucocytaire (Zhang et Chopp, 1999). Il est à noter qu'à côté du risque hémorragique, le rt-PA augmente également d'un facteur 1,9 à 2,7 (essai clinique IST-3) le risque d'œdème cérébral fatal (IST-3 collaborative group et al., 2012; Thiebaut et al., 2018). L'étude ICARO a confirmé ces résultats avec un taux d'œdème cérébral fatal de 3,1% dans les patients non traités et de 8,3% après traitement par le rt-PA (Paciaroni et al., 2012a; Paciaroni et al., 2012b).

Enfin, le rt-PA, outre sa toxicité vasculaire, entraîne également une toxicité neuronale car il a la capacité de traverser la BHE (Benchenane et al., 2005). Il potentialise notamment l'excitotoxicité médiée par l'activation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate ou NMDA (Chevilley et al., 2015; Kaur et al., 2004; Nicole et al., 2001; Vivien et al., 2011; Yepes et al., 2009).

En conclusion, en raison de sa fenêtre thérapeutique étroite et de ses contre-indications liées au risque hémorragique (Adibhatla et Hatcher, 2008; Pandian, 2009), l'administration du rt-PA n'est réalisée que chez moins de 5% des patients (Heuschmann et al., 2003; Mahagne, 2008; Cronin, 2010; IST-3 collaborative group et al., 2012). Chez les patients qui en bénéficient, l'efficacité n'est pas toujours au rendez-vous et les risques de TH sont par contre bien présents.

8.2) Thrombectomie

La thrombectomie endovasculaire consiste en l'ablation mécanique d'un caillot, souvent utilisée en complément de la thrombolyse (Fisher and Saver, 2015) ou pour les patients ayant dépassé la fenêtre thérapeutique du rt-PA, jusqu'à 24 heures après l'AVC (Albers et al., 2018; Nogueira et al., 2018). Trois essais (IMS III, Rescue et Synthesis) évaluant les dispositifs de 1^{ère} génération (MERCI ou Penumbra) publiés en 2013 ont démontré que la thrombectomie endovasculaire avait des résultats équivalents au traitement par thrombolyse (Broderick et al., 2013; Derex et al., 2018).

De nombreux essais cliniques ont évalué l'efficacité des dispositifs de deuxième génération (tels que les stents retrievers ; Evans et al. 2017): SWIFT (Saver et al., 2015), TREVO-2, MR CLEAN (Berkhemer et al., 2015), ESCAPE TRIAL (Goyal et al., 2015), EXTEND-1A (Campbell, et EXTEND-IA Investigators 2015), REVASCAT (Jovin et al., 2015; Smith Wade et Yan, 2015), THRACE (Bracard et al., 2016), THERAPY (Mocco et al., 2016), PISTE (Muir et al., 2017), EASI (Khoury et al., 2017). Ces études ont démontré une supériorité de la thrombectomie précoce associée à la thrombolyse par rapport à la thrombectomie seule avec notamment une augmentation d'un facteur 2 du taux de revascularisation à 24h et d'indépendance fonctionnelle à 90 jours (Smith et al., 2008; Saver et al., 2012, 2012; Berkhemer et al., 2015; Goyal et al., 2015; Saver et al., 2015; Campbell et EXTEND-IA Investigators 2015; Jovin et al., 2015; Bracard et al., 2016). De plus, ces dispositifs augmentent la probabilité d'amélioration de 1 point ou plus sur le mRS sans augmenter le risque d'hémorragie intracérébrale symptomatique, ou de mortalité, toutes causes confondues (Badhiwala et al., 2015; Goyal et al., 2016).

Une méta-analyse (13 études obtenues sur PubMed et EMBASE) confirme ces résultats en concluant que l'association de la thombectomie au rt-PA augmente le bénéfice fonctionnel et le taux de recanalisation, diminue la mortalité et ne modifie pas le risque d'hémorragie intracérébrale comparé à la thrombectomie seule (Mistry et al., 2017). Cependant, une méta-analyse plus récente et plus complète réalisée sur 20 études et 5 279 patients a comparé la thrombectomie chez les patients admissibles ou non au rt-PA. Cette étude n'a démontré aucun intérêt particulier de l'association thrombectomie et rt-PA comparé à la thrombectomie seule sur les principaux critères : indépendance fonctionnelle à 90 jours, mortalité à 90 jours, taux de recanalisation et hémorragie intracérébrale (Kaesmacher et al., 2019). De plus, cette étude évoque de potentiel biais dans la précédente méta-analyse (Mistry et al., 2017) dont un déséquilibre dans les groupes et sur les délais de traitements.

L'amélioration des résultats de la thrombectomie endovasculaire au cours d'essais récents peut être attribuée à une meilleure sélection des patients par tomодensitométrie ou angiographie IRM, une revascularisation plus rapide, des dispositifs de seconde génération permettant des taux plus élevés de reperfusion (Badhiwala et al., 2015; Goyal et al., 2016; Warach et al., 2016). Les essais en cours évaluent si les patients avec de petits cœurs ischémiqúes et une importante pénombre, identifiée par tomодensitométrie ou IRM, pourraient bénéficier de l'altéplase et d'une thrombectomie endovasculaire au-delà de 6 heures (Warach et al., 2016). Les premiers résultats de deux essais cliniques (DAWN : 6-24h et DEFUSE-3 : 6-15h) semblent indiquer que la thrombectomie serait bénéfique pour les patients au-delà de 6h et jusqu'à 24h (Norrving, 2019).

Le développement d'algorithmes permettant d'identifier rapidement et précisément les patients victimes d'un AVC et pouvant bénéficier de l'altéplase et/ ou de la thrombectomie est également une voie d'avenir afin d'aider les services médicaux d'urgence à identifier et transporter rapidement les patients vers les équipes spécialisées pour qu'elles puissent rétablir la reperfusion dans les 90 minutes.

DEUXIÈME PARTIE : Le stress oxydant dans l'ischémie cérébrale : état de l'art et perspectives thérapeutiques

Les organismes vivants ont la capacité de capter l'oxygène moléculaire (O_2) à partir de l'environnement pour le transmettre aux cellules au cours de la respiration aérobie. Le métabolisme aérobie est associé à des réactions d'oxydation continues, très contrôlées, accompagnées de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ERO et ERN ; Di Meo et al., 2016).

Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ERON) sont des espèces chimiques dérivés de l'oxygène ou de l'azote, et peuvent être divisées en 2 groupes : les radicaux libres qui présentent des électrons de valence non appariés et les espèces non radicalaires ; les espèces réactives peuvent être synthétisées de novo (ER primaires) ou peuvent dériver d'autres espèces réactives (ER secondaires). Le Tableau III présente les principales ERON (Parke et Sapota, 1996; Fridovich, 1997; Halliwell, 2006; Pacher et al., 2007; Valko et al., 2007).

Physiologiquement, la production d'espèces réactives de l'oxygène telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxyles (HO^{\bullet}) et l'anion peroxynitrite ($ONOO^-$) est contrôlée par les enzymes antioxydantes endogènes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), et les systèmes antioxydants non enzymatiques tels que le glutathion, l'acide urique et les vitamines C et E.

Le concept de stress oxydant a été formulé pour la première fois en 1985 dans le chapitre introductif de l'ouvrage « *Oxidative Stress* » en tant que « perturbation de l'équilibre pro-oxydant/antioxydant » (Sies et Cadenas, 1985). Le terme stress oxydant est donc utilisé lorsque les systèmes de défense antioxydants sont complètement submergés par la production d'espèces réactives, et que l'équilibre entre production et élimination est perturbé en faveur des oxydants, provoquant une perturbation de la signalisation, du contrôle redox et des dommages moléculaires et cellulaires (Sies, 2007 ; Sies, 2015; Sies et al., 2017; Sies, 2018).

Tableau III : Espèces réactives : Diversité et nature chimique.

D'après Sies et al., 2017.

| Free radicals | Nonradicals |
|---|---|
| <i>Reactive oxygen species</i> | |
| Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) | Hydrogen peroxide (H_2O_2) |
| Hydroxyl radical (OH^{\bullet}) | Organic hydroperoxide (ROOH) |
| Peroxyl radical (ROO^{\bullet}) | Singlet molecular oxygen ($O_2^1\Delta_g$) |
| Alkoxy radical (RO^{\bullet}) | Electronically excited carbonyls (RCO) ^a |
| | Ozone (O_3) |
| <i>Reactive chlorine/bromine species</i> | |
| Atomic chlorine (Cl^{\bullet}) | Hypochlorite (OCl^-) |
| Atomic bromine (Br^{\bullet}) | Chloramines (RNHCl) |
| | Hypobromite (OBr^-) |
| <i>Reactive nitrogen species</i> | |
| Nitric oxide = nitrogen monoxide (NO^{\bullet}) | Nitrite (NO_2^-) |
| Nitrogen dioxide (NO_2^{\bullet}) | Nitroxyl anion (NO^-) |
| | Peroxynitrite ($ONOO^-$) |
| | Peroxynitrate (O_2NOO^-) |
| | Nitrosoperoxycarbonate ($ONOOCO_2^-$) |

1) Génération des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

1.1) L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

Les principales sources physiologiques d' $O_2^{\bullet-}$ sont les complexes mitochondriaux et les NADPH-oxydases (Bedard and Krause, 2007; Fitzpatrick, 2004; Gonzalez, 2005; Matsumoto et al., 2003; Turrens, 2003).

1.1.1) La mitochondrie

Les mitochondries, dont la fonction principale est la production d'ATP par le processus de phosphorylation oxydative, possèdent dans leur membrane une chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) constituée d'une chaîne de transport des électrons (ETC), elle-même composée de complexes enzymatiques (Figure 7). Les $O_2^{\bullet-}$ sont des produits du fonctionnement de l'ETC (Murphy, 2009).

L'ETC est localisée dans la membrane mitochondriale interne. Elle est composée de quatre complexes enzymatiques (I, II, III, IV) incluant des composés de faible poids moléculaire pour transférer les électrons de haute énergie à partir du NADH ou $FADH_2$ produit dans la matrice mitochondriale jusqu'à l'accepteur final, l' O_2 (Alberts et al., 2002). Le transport des électrons à

travers l'ETC s'accompagne d'une libération d'énergie des électrons, qui est transformée en potentiel électrochimique transmembranaire ($\Delta\mu H$) utilisé pour la biosynthèse d'ATP par le processus de phosphorylation oxydative. La fonction principale de l'ETC est la réaction de réduction complète : $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2 H_2O$ mais cette réduction peut être incomplète, provoquant la formation de l'anion superoxyde : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$ (Brand, 2016).

Bien que l' $O_2^{\bullet-}$ soit difficile à détecter dans les mitochondries, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques a permis de montrer l'implication des complexes I (NADH-COQ oxydoréductase ou NADH-déshydrogénase) et III (CoQ-cytochrome c oxydoréductase) des ETC dans la production d' $O_2^{\bullet-}$ (Figure 7).

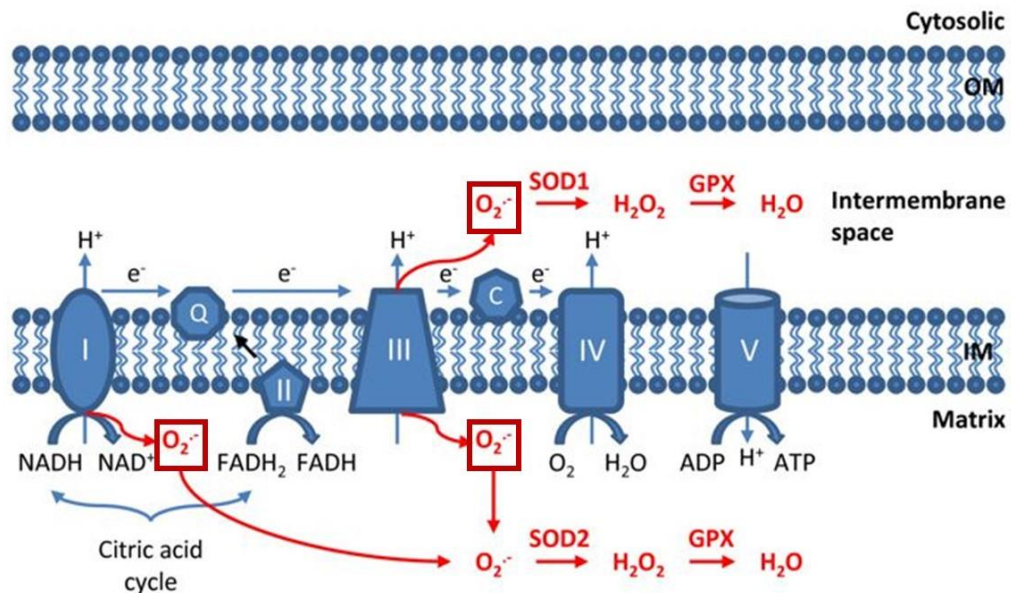


Figure 7 : Fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et production d'anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Abréviations : OM : Membrane externe ; IM : Membrane interne ; NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide ; $FADH_2$: Flavine adénine dinucléotide. D'après Li et al., 2013.

1.1.2) Famille des NADPH - oxydases (NOX)

Les NADPH-oxydases (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) constituent une famille d'enzymes qui, contrairement aux chaînes de transport d'électrons mitochondriales, produisent des ERO comme produit principal (Bedard and Krause, 2007).

Il existe 7 membres de la famille NOX connus à ce jour (NOX1, 2 [pg91phox], 3, 4, 6, Duox1 et 2) dont les isoformes NOX2, 3 et 4 prédominent dans le système nerveux central (SNC ; Drummond et Sobey,

2014; Ma et al., 2017). La NOX2 phagocytaire a été le premier système identifié comme générant des ERO en tant que produit primaire plutôt que sous-produit (Rossi et Zatti, 1964; Miller et al., 1990). Dans ce contexte, $O_2^{\bullet-}$ est un agent antibactérien produit par des cellules phagocytaires telles que les neutrophiles et les macrophages (Fialkow et al., 2007; Garaude et al., 2016; Gieche et al., 2001; Matono et al., 2014). Les NOX 1 et 5 sont également impliquées dans la production d' $O_2^{\bullet-}$ (Drummond et Sobey, 2014; Ma et al., 2017). Les NOX ont également été identifiées dans diverses cellules non phagocytaires en tant que protéines transmembranaires (Jiang et al., 2011; Petry et al., 2010) leur permettant de transférer des électrons à travers les membranes biologiques. En condition pathologique (notamment par l'activation des récepteurs NMDA), les NOX contribuent donc au stress oxydant en surproduisant l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$: $NADPH + 2 O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2 O_2^{\bullet-}$ (Brennan et al., 2009; Girouard et al., 2009a).

1.1.3) Autres sources de production de l'anion superoxyde

Les lipoxgénases (**LOX**) et les cyclo-oxygénases (**COX**) métabolisent l'acide arachidonique (AA) en prostaglandines (PG), thromboxane et leucotriènes pouvant stimuler les **NOX** (Andreou and Feussner, 2009; Chattopadhyay et al., 2015; Martínez-Revelles et al., 2013; Yun et al., 2010). Les ERO peuvent être générés directement par la LOX et la COX ou par les sous-produits de l'oxydation de l'AA (Swindle et al., 2007). La **LOX** produit des hydroperoxydes à partir de la réduction d'AA en acide hydroxy-eicosatétraénoïque (HETE) ou la conversion de l'AA en leucotriènes (Andreou and Feussner, 2009). Il existe plusieurs types de LOX en fonction de la position de l'insertion de l'oxygène dans l'AA : 5-, 8-, 12- et 15-LOX (Cho et al., 2011). Divers métabolites de la 12-LOX et de la 15-LOX stimulent la production d'ERO par la NOX dans différents types de cellules en conditions physiologiques ou pathologiques (de Carvalho et al., 2008; Mahipal et al., 2007).

La xanthine oxydoréductase (**XOR**) qui convertit irréversiblement l'hypoxanthine en xanthine, puis la xanthine en acide urique, utilise l' O_2 comme accepteur final d'électron générant ainsi de l' $O_2^{\bullet-}$ (Harrison, 2002; Kostić et al., 2015). En condition normoxique, une autre forme de cette enzyme, la Xanthine Deshydrogénase (XDH), utilise le NAD et ne produit pas de radicaux libres (Granger et al., 1981)

1.2) Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

H₂O₂ est un composé majeur dans la détection redox, c'est une molécule clé dans la signalisation et la régulation cellulaire en condition physiologique dénommée « eustress » (Sies et al., 2017). H₂O₂ est le peroxyde le plus simple formé dans des conditions aérobies (à une concentration intracellulaire d'O₂ d'environ 10nM), il est le plus puissant oxydant en solution acide (Sies, 2014) et peut être converti en HO• hautement réactif. H₂O₂ est généré par les mitochondries *via* la réaction spontanée de dismutation de l'O₂•⁻ ou catalysée par la SOD (Fridovich, 1997; Murphy, 2009) : $2 O_2\bullet^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. La production d'H₂O₂ peut également résulter de réactions catalysées par les NOX (Dupuy et al., 1991) telles que la NOX4 et Duox (Drummond and Sobey, 2014; Ma et al., 2017; Tyurin-Kuzmin et al., 2016). Les mitochondries, le réticulum endoplasmique (RE) et les peroxysomes contribuent aussi à la formation d'H₂O₂ (Elsner et al., 2011; Sies, 2014).

Des études sur la réponse cellulaire au stress oxydant induit par H₂O₂ ont permis de différencier les concentrations en H₂O₂ physiologiques et oxydantes (Sies, 2014; Sies et al., 2017) :

- Concentration de 1 à 10 nM : « Eustress » observé en condition physiologique.
- Concentration de 10 à 100 nM : « Stress adaptatif »
- Concentration > 100 nM : Stress Oxydant induisant des dommages aux biomolécules (acides nucléiques, lipides, protéines).

1.3) Le monoxyde d'azote (•NO)

Le •NO est un radical « faible », produit lors de la conversion de la L-arginine en L-citrulline en présence d'oxygène moléculaire. Cette réaction est catalysée par les NO-Synthases (NOS) qui utilisent le NADPH, le FAD, le FMN et la tétrahydrobioptérine (BH₄) comme cofacteurs (Rosen et al., 2002). Il existe 3 isoformes majeures de NOS :

- **La NOS neuronale (NOSn, NOS I)** : Exprimée de manière constitutive dans le SNC, le SNP (système nerveux périphérique) et quelques autres tissus, elle est impliquée dans la signalisation synaptique et participe à la plasticité du SNC par le biais de la neurogènes, de l'apprentissage, de la mémoire et d'autres fonctions (Costa et al., 2016; Zhou and Zhu, 2009)
- **La NOS inducible (NOSi, NOS II)** : Exprimée dans de nombreux types de cellules en réponse à une stimulation par des cytokines telles que le TGF-β, l'IL-4, l'IL-10 et l'IFNγ, elle est impliquée dans le système immunitaire (fonction cytotoxique des macrophages), la

neutralisation des agents pathogènes, l'inflammation et l'athérosclérose (Green et al., 1990, 1994; Lind et al., 2017)

- **La NOS endothéliale (NOSe, NOS III)** : Exprimée constitutivement dans les cellules endothéliales vasculaires (Förstermann and Sessa, 2012), elle est impliquée dans l'homéostasie vasculaire et l'angiogenèse (Förstermann and Münzel, 2006) et joue donc un rôle dans le contrôle de la vasodilatation, de la prolifération des cellules endothéliales, de l'agrégation plaquettaire et de la biogénèse mitochondriale (processus par lequel les cellules augmentent la masse mitochondriale ; Lähteenvuo et Rosenzweig, 2012; Sanchis-Gomar et al., 2014; Garcia et Sessa, 2019).

De plus, une NOS mitochondriale (NOSmt) a été identifiée comme l'isoforme alpha de la NOSn, enzyme dont les niveaux d'expression sont augmentés dans diverses conditions physiopathologiques (Lacza et al., 2009).

Toutes les isoformes de NOS existent sous forme monomérique ou homodimérique, contenant une réductase sur leur domaine C-terminal et une oxygénase sur le domaine N-terminal (Klatt et al., 1996). Dans leur domaine réductase, toutes les NOS ont un site de fixation à la calmoduline (CaM) qui lie le Ca^{2+} provoquant des changements de conformation des NOS pour améliorer le transfert d'électrons entre les domaines réductase et oxygénase (Piazza et al., 2015). L'affinité de la CaM pour les NOSn et NOSe est augmentée par les concentrations élevées en Ca^{2+} intracellulaire, alors que l'iNOS a une forte affinité même avec des concentrations calciques très faibles.

L'activité NOS peut être modifiée par des interactions protéines-protéines et des modifications chimiques telles que la phosphorylation ou la S-glutathionylation (Chen et al., 2010; Hinchee-Rodriguez et al., 2013; Su, 2014). Ces modifications dans leur domaine réductase peuvent provoquer un découplage de la NOS et conduire à la génération de radicaux $O_2\bullet^-$. Dans les cellules endothéliales en particulier, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) peut induire la phosphorylation de la NOSe et la génération d' $O_2\bullet^-$.

1.4) L'anion peroxy-nitrite (ONOO⁻)

Le $\bullet NO$ interagit rapidement avec $O_2\bullet^-$ pour former une autre ERN très puissante, l'anion peroxy-nitrite (ONOO⁻) : $O_2\bullet^- + \bullet NO \rightarrow ONOO^-$ (Pryor et Squadrito, 1995; Guzik et al., 2002; Pacher et al., 2007).

Cette réaction est contrôlée par la SOD qui diminue le niveau d' $O_2\bullet^-$, mais elle peut surpasser la

dismutation enzymatique d' $O_2^{\bullet-}$ (Guzik et al., 2002). $ONOO^-$ est une espèce hautement réactive ; en condition physiologique, en raison de sa réaction avec des molécules cibles et d'une isomérisation en nitrate catalysée par les protons, sa demi-vie est de $1/10^{\text{ème}}$ de seconde (Pryor and Squadrito, 1995). $ONOO^-$ peut réagir avec le CO_2 pour former du nitrosoperoxycarbonate ($ONOOCO_2^-$) qui subit également une fission homolytique :

$ONOO^- + CO_2 \rightarrow ONOOCO_2^- \rightarrow \bullet NO_2 + CO_3^{\bullet-}$, produisant des radicaux carbonates anioniques ($CO_3^{\bullet-}$) très oxydants (Meli et al., 2002; Squadrito and Pryor, 1998). De plus, le taux d'interaction de $ONOO^-$ avec le CO_2 est très élevé comparé à l'interaction avec les protéines (Abate et al., 1990; Lymar and Hurst, 1995; Pace and Weerapana, 2014). L' $ONOO^-$ peut également réagir avec des ions métalliques de transition (Fe ou Cu) formant, *in fine*, le radical $\bullet NO_2$ et des complexes oxo-métalliques : **$ONOO^- + Fe^{2+}\text{- protéine} \rightarrow ONOO\text{-}Fe^{3+}\text{- protéine} \rightarrow \bullet NO_2 + O\text{=}Fe^{3+}\text{- protéine}$** . Enfin, l'acide peroxy-nitreux $ONOOH$ (80% des $ONOO^-$ à pH 6.2) peut provoquer une oxydation du groupe Cys-thiol sous forme thiolate ($R-S^-$) formant ainsi de l'acide cystéine-sulfinique ($R-SOH$) :

$R-S^- + ONOOH \rightarrow R-SOH + NO_2^-$. $ONOOH$ peut également subir une décomposition rapide par homolyse :

$ONOOH \rightarrow \bullet NO_2 + HO\bullet$ (Lymar et al., 2003).

1.5) Les radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être centrés sur l'oxygène ($HO\bullet$, $ROO\bullet$ et $RO\bullet$), l'azote ($NO\bullet$) ou le carbone ($R\bullet$; Halliwell, 1999; Vladimirov et Proskurnina, 2009; Forman, 2016). $HO\bullet$ peut être produit par fission homolytique de l'acide peroxy-nitreux ($ONOOH$) :

$ONOOH \rightarrow \bullet NO_2 + HO\bullet$ (Lymar et al., 2003) où par interaction de H_2O_2 avec $O_2^{\bullet-}$. $HO\bullet$ a la durée de vie la plus courte de tous les radicaux libres ($10^{-9}s$; Kabel, 2014).

Les radicaux primaires peuvent induire la production de radicaux secondaires ($HO\bullet$, $RO\bullet$ et $ROO\bullet$). Par exemple :

- en présence de l'ion ferrique, l' H_2O_2 peut produire des radicaux hydroxyles ($HO\bullet$) par la réaction de Fenton : **$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO\bullet + OH^- + Fe^{3+}$** puis **$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$** (Stadtman et Berlett, 1991).

- $O_2^{\bullet-}$ peut produire des radicaux hydroxyles ($HO\bullet$) par la réaction d'Haber-Weiss : **$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow HO\bullet + OH^- + O_2$** (Koppenol, 2001).

De plus, les radicaux libres sont très réactifs vis-à-vis d'autres molécules qu'ils décomposent et endommagent, propageant ainsi une nouvelle production de radicaux libres. Ce phénomène a été

décrit dès les années 1950 sous le nom de réaction en chaîne de radicaux libres (Semenov, 1959). La figure 8 résume les différentes sources d'ERON.

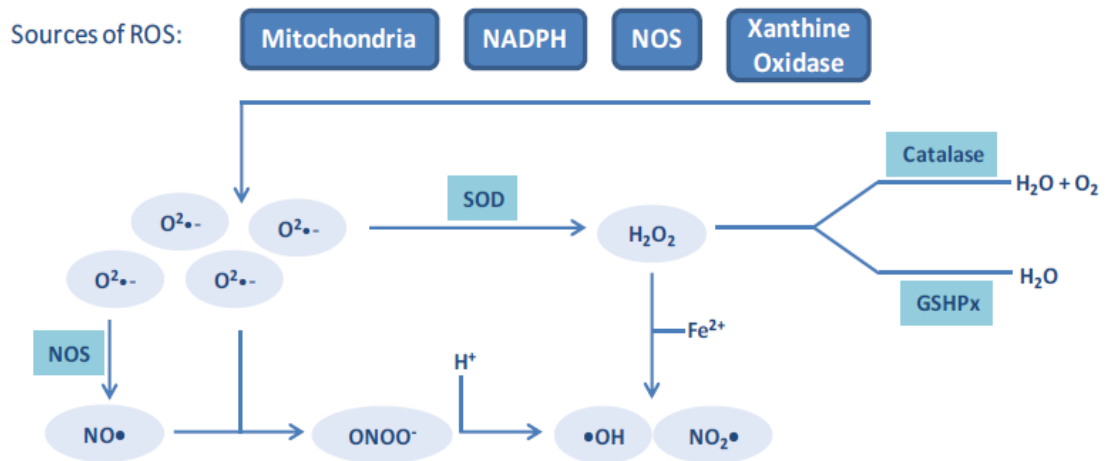


Figure 8 : Représentation des différentes sources d'ERON.

Abréviations : **NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, **NOS** : NO-Synthase ; **SOD** : Superoxide dismutase ; **GSHPx** : Glutathion peroxydase. D'après Shirley et al., 2014.

La concentration de ces différentes espèces réactives de l'oxygène et de l'azote est maintenue dans des normes physiologiques grâce à différents systèmes antioxydants enzymatiques ou non.

2) Systèmes antioxydants endogènes

Les systèmes antioxydants endogènes, enzymatiques et non enzymatiques, ont la capacité de transformer les espèces réactives en espèces moins ou non réactives. En condition physiologique, ces systèmes conjuguent leurs effets pour maintenir l'homéostasie redox et protéger les cellules.

2.1) Systèmes enzymatiques

Parmi les systèmes antioxydants enzymatiques, la superoxyde dismutase ou **SOD** joue un rôle clé dans la détoxification des anions $O_2^{\bullet-}$ en catalysant la réaction : $2 O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ (ou $2 O_2^{\bullet-} + 2 H_3O^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2 + 2 H_2O$; Fridovich, 1997).

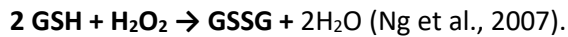
Il existe 3 types de SOD : la SOD1, à cuivre et zinc, cytoplasmique et dans l'espace intermembranaire des mitochondries, la SOD2 à manganèse et la SOD3, à Cu/ Zn comme la SOD1, mais extracellulaire (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). La SOD1 mitochondriale peut être libérée en même temps que le cytochrome C en réponse à l'oxydation des groupes Cys-thiol et au gonflement mitochondrial induit par l'adénine nucléotide translocase (ANT) sous l'effet des ERO (Liu et Chen, 2013). *Via* l'élimination d' $O_2^{\bullet-}$, la SOD peut inhiber la formation d' $ONOO^-$ (à partir de $\bullet NO$), s'opposant ainsi au dysfonctionnement mitochondrial et endothélial (Che et al., 2016).

Le métabolisme et la neutralisation de l' H_2O_2 sont assurés par la catalase ou **CAT** (Radi et al., 1991; Cao et al., 2003; Scibior et Czczot, 2006; Domínguez et al., 2010; Glorieux et Calderon, 2017; Sepasi Tehrani et Moosavi-Movahedi, 2018) et différentes peroxydases (Prx) dont la glutathion peroxydase (GPx; Noichri et al., 2015; Flohé, 2016; Rhee, 2016; Netto et Antunes, 2016). La CAT, enzyme homotétramérique, est retrouvée dans différents compartiments cellulaires comme les peroxysomes ou les mitochondries (Radi et al., 1991). Chacune des sous unités contient un groupe hème au niveau de son site actif (Domínguez et al., 2010). Quand la teneur en H_2O_2 est élevée, la CAT transforme 2 molécules d' H_2O_2 pour donner 2 H_2O et O_2 selon la réaction :



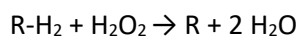
Les glutathion peroxydases (**GPx**) constituent une famille d'enzymes à base de cystéine qui jouent un rôle clé dans la régulation métabolique et la signalisation cellulaire en contrôlant les niveaux d' H_2O_2 dans les systèmes biologiques (Flohé, 2016). Il existe 8 sous-types de GPx : GPx1 cytoplasmique, ubiquitaire et impliquée dans la signalisation induite par l'insuline ; GPx2 localisée dans le tractus

gastro-intestinal impliquée dans la prévention de l'inflammation ; GPx3 associée à la membrane ; GPx4 mitochondriale impliquée dans la régulation de l'apoptose et qui interagit avec les lipoprotéines et le cholestérol endommagés par les ERO ; GPx5 impliquée dans la fertilité masculine, GPx 6, 7 et 8 qui sont localisées dans le réticulum endoplasmique et impliquées dans le repliement des protéines (Espinoza et al., 2008; Lubos et al., 2011; Brigelius-Flohé et Maiorino, 2013). Pour leur activité, les GPx utilisent 2 molécules du glutathion réduit (**GSH** : γ -glutamyl-cystéinyl-glycine) :



Le GSSG peut être régénéré par la glutathion réductase dépendante du NADPH : $\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2 \text{ GSH} + \text{NADP}^+$ (Flohé, 2016).

Les peroxydases (**Prx**), à base de Cystéine, sont très abondantes dans tous les compartiments subcellulaires. Les Prx possèdent un site de liaison à haute affinité pour l' H_2O_2 (Rhee, 2016; 2017a; et 2017b). La famille Prx est composée de 6 membres (PRX 1 à 6 ; Rhee et Kil, 2017) qui permettent de dégrader l' H_2O_2 selon la réaction suivante :



La thiorédoxine (Trx) forme un complexe avec la thiorédoxine réductase (TrxR) et le NADPH et joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie et la modulation de la signalisation redox (Lee et al., 2013; Netto et Antunes, 2016). Il existe deux isoformes : Trx1 cytoplasmique pouvant être transloquée dans le noyau et Trx2 mitochondriale. La forme réduite de Trx contient un groupe Cys-thiol qui est impliqué dans la réaction d'échange disulfure-thiol ; la forme oxydée contient une liaison dissulfure, réduite par TrxR, une enzyme utilisant le NADPH (Saccoccia et al., 2014).

2.2) Systèmes non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques peuvent être divisés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques : hydrophile ou hydrophobe/lipophile. Les agents hydrophiles dont l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide α -lipoïque (ALA), et le glutathion réduit (GSH) sont localisés dans le cytoplasme, le noyau et la matrice mitochondriale (Nimse and Pal, 2015). Les agents hydrophobes tel que l' α -tocophérol (vitamine E) et le rétinol (vitamine A) sont localisés dans la membrane cellulaire ou celle d'organelles intracellulaires où ils bloquent les réactions de peroxydation lipidique (Chaudière and Ferrari-Iliou, 1999). La plupart des antioxydants naturels non enzymatiques (les vitamines, les bioflavonoïdes et les caroténoïdes) ne sont pas synthétisés par les cellules mais sont apportés par

l'alimentation (Kabel, 2014; Nimse and Pal, 2015), et nombre d'entre eux sont utilisés en tant que cofacteurs. Par exemple, l'acide ascorbique est impliqué dans des réactions redox en tant que cofacteur de la monooxygénase (Hacisevki, 2009). De plus, à pH physiologique, l'acide ascorbique existe sous forme mono anionique et peut facilement donner un électron pour subir une oxydation en acide semi-déshydroascorbique assez peu réactif et ainsi capter un radical HO• : Acide ascorbique → Acide semi-déhydroascorbique-O• → Acide déhydroascorbique (DHA) + H₂O. Le DHA peut être ensuite réduit en acide ascorbique par le GSH. Les effets antioxydants de l'acide ascorbique sont dose-dépendants, il inhibe les NOX, limitant ainsi la production d'O₂•⁻ (ou son élimination directe) et de ONOO⁻ (May et al., 2005; Oudemans-van Straaten et al., 2014).

L'ALA joue le rôle de cofacteur du complexe pyruvate déshydrogénase et peut exercer des effets antioxydants directement en captant les ERO ou indirectement *via* la chélation des ions de métaux de transition (Rochette et al., 2013). Il a été utilisé dans de nombreux modèles *in vivo* de pathologies associées à un déséquilibre redox notamment dans la prévention et le traitement du diabète (Rochette et al., 2015).

Parmi les 4 tocophérols (α , β , γ et δ) ayant des propriétés antioxydantes similaires, seul l' α -tocophérol (Vit E) a une haute affinité pour son transporteur spécifique : la protéine de transfert du tocophérol. La vitamine E maintient la qualité membranaire en captant les radicaux peroxydes (LOO•), afin de protéger les acides gras polyinsaturés (AGPI) de l'oxydation (Traber and Atkinson, 2007).

Ainsi les systèmes antioxydants permettent de maintenir les ERON à des concentrations relativement faibles auxquelles ils exercent un rôle physiologique.

3) Rôle physiologique des ERON

Le terme « Eustress » est utilisé lorsque les ERON jouent un rôle physiologique, bénéfique et essentiel pour les cellules (Niki, 2016 : « Oxidative stress and antioxidants : Distress or eustress ? »). De faibles concentrations d'ERON ont en effet un rôle dans la signalisation cellulaire qui régule diverses fonctions : les processus métaboliques, l'expression génique, le cycle cellulaire, l'organisation du cytosquelette, la prolifération/ différenciation/ migration cellulaire, la régénération des tissus et l'apoptose (Finkel, 2011; Forman et al., 2014; Schieber et Chandel, 2014; Adams et al., 2015; Weidinger et Kozlov, 2015; Forman, 2016).

De plus, l'homéostasie redox est une caractéristique essentielle à la réponse cellulaire aux conditions de stress tandis que le stress oxydant serait l'établissement d'un nouvel état « d'équilibre » redox (Ursini et al., 2016). Ainsi, le terme d'« oxidative eustress » a été proposé pour définir la réponse cellulaire à la génération d'ERON dans des conditions physiologiques/ bénéfiques (Niki, 2016).

Cependant, la surproduction d'ERON ou l'altération du fonctionnement des systèmes antioxydants endogènes modifient cet équilibre et entraînent un stress oxydant dont les conséquences sont délétères.

4) Rôles délétères des ERON

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre la génération d'ERON et la capacité des systèmes antioxydants endogènes à les détoxifier (Sies et al., 2017). Le stress oxydant provoque des modifications irréversibles des biomolécules telles que les protéines, lipides et acides nucléiques (Niki, 2016) et est impliqué dans de multiples maladies (Egea et al., 2017).

4.1) Oxydation des protéines

Les principaux types de réaction des ERON avec les protéines sont l'oxydation des acides aminés, la génération de protéines carbonylées ou nitrosylées, l'oxydation et la fragmentation du squelette protéique (Berlett and Stadtman, 1997).

4.1.1) Oxydation des acides aminés

Les fonctions thiols des cystéines et le cycle aromatique de la tyrosine sont particulièrement sensibles à l'oxydoréduction (Tien et al., 1999; Daiber et al., 2013; Go et al., 2015; Torres-Cuevas et al., 2016).

4.1.1.1) Oxydation des cystéines

Les cystéines sont sensibles à l'oxydoréduction en raison de leur groupe thiol (-SH ; Go et al., 2015; Perrin et Koppenol, 2000). Les résidus Cys peuvent être ionisés en thiolate : $\mathbf{R-S}^-$ puis oxydés en radicaux thiyle : \mathbf{RS}^\bullet (Davies, 2011; Rayner et al., 2014). Ces radicaux \mathbf{RS}^\bullet peuvent être impliqués

dans la formation de liaisons disulfure (S-S), les liaisons S-S intramoléculaires peuvent accélérer le repliement de la protéine (Ng et al., 2007). **RS•** peut également réagir avec **•NO** pour former du Cys S-nitrosylé dans les protéines (Klomsiri et al., 2011) ou avec **ONOO⁻** produisant de l'acide Cys-sulfénique **R-SOH** pouvant former du **•NO₂** et **CO₃•⁻** (Bonanata et al., 2017; DeMaster et al., 1995). L'acide Cys-sulfénique **R-SOH** peut être stable ou subir une hyperoxydation en acide Cys-sulfinique **R-SO₂H** ou en acide Cys-sulfonique **R-SO₃H** (Carballal et al., 2003; Kim et al., 2015). **R-SOH** peut également former du sulfénylamide (**RSNHR**) par cyclisation avec un groupe NH voisin ou du disulfure mixte (**RSSR'**) avec le groupe SH d'une autre molécule dont le GSH (S-glutathionylation ; Townsend et al., 2014). Enfin, le sulfure d'hydrogène (H₂S) peut convertir SH en persulfure **R – SSH** (S-persulfuration ; Paul et Snyder, 2015) qui peut former des radicaux perthiyles (**RSS•**) plus stables que les radicaux thiyles (**RS•**). Les radicaux **RSS•** ne réagissent pas avec O₂ ou **•NO**, mais peuvent subir une dimérisation pour donner du tétrasulfure : **R-SS-SS-R** (Bianco et al., 2016).

4.1.1.2) Oxydation de la tyrosine (Tyr) et du tryptophane (Trp)

L'oxydation de Tyr et Trp induit des ouvertures de cycle pour former des hydroperoxydes : **R-OOH** (Wright et al., 2002). En présence d'une amine libre, le cycle aromatique se ferme rapidement pour former des hydroperoxydes d'indole qui se décomposent ensuite en alcool (Wright et al., 2003). Tyr subit diverses modifications oxydatives pour former de la 3-hydroxytyrosine, de la 3-nitrotyrosine ou de la tyrosine halogénée (Houée-Lévin et al., 2015). L'exposition aux ERO tels que **•OH** produit des radicaux tyrosyle, produisant des réticulations inter et intramolécules par dimérisation de Tyr et formation de 3,3'-dityrosine (Annibal et al., 2016). La Tyr et le Trp peuvent également subir des réactions de nitrosylation.

4.1.2) Génération de protéines carbonylées et nitrosylées

L'oxydation des acides aminés, peptides et protéines provoque la formation de groupe carbonyle C=O, amide CONH₂ et la libération d'ammoniac (Jayko and Garrison, 1958).

Le **•NO** et **ONOO⁻** induisent la S-nitrosylation (formation du groupe **-SNO**) et la S-glutathionylation (formation **S-S** avec GSH) des protéines. La S-glutathionylation est régulée par la glutathion S-transférase (GSTP) et la famille de la thioredoxine Grx (Grx 1 et 2 ; Fernandes et Holmgren, 2004; Jones et al., 2016). Enfin, la nitration de Tyr et Trp passe par leur interaction avec **•OH** et la formation de radicaux **tyrosyle** et **tryptophanyl**. En présence de **•NO₂**, Tyr et Trp forment respectivement la 3-

nitrotyrosine et le **6-nitrotryptophane** (Nuriel et al., 2011; Batthyány et al., 2017). Tyr ne possède qu'un seul carbone réactif, contrairement à Trp qui en contient de nombreux, pouvant induire un large éventail de produits d'oxydation et de nitration bien que le 6-nitrotryptophane soit le principal et le plus stable (Suzuki et al., 2004; Nuriel et al., 2011).

4.1.3) Oxydation et fragmentation du squelette protéique

Les principaux produits d'oxydation des acides aminés aliphatiques (Ala, Val, Leu, Ile) sont des hydroperoxydes protéiques R-OOH (Saladino et al., 2009), puis des radicaux R•, RO•, ROO• qui sont formés dans le squelette protéique (Davies et al., 1995; Wright et al., 2003; Davies, 2004). Les radicaux RO• induisent un clivage du cytosquelette et une fragmentation protéique qui donne naissance à des radicaux (RO•), des aldéhydes (formaldéhyde) et des cétones (acétone ; Headlam et Davies, 2002, 2003, 2004).

4.2) Oxydation des lipides

La peroxydation lipidique (ou lipoperoxydation) est un phénomène d'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI). Cette réaction peut être rapide, avec addition directe d'oxygène dans les doubles liaisons des AGPI ($^1\text{O}_2$) ou plus lente, par une réaction en chaîne des radicaux libres ($^3\text{O}_2$, •OH) en 3 étapes (Cillard and Cillard, 2006). Ces étapes sont l'initiation, la propagation et la terminaison. **L'initiation** produit le radical lipidique (L•), par action des radicaux •OH ou HOO• mais également par des radicaux lipidiques (LO• et LOO•) formés durant l'étape suivante. La **propagation** consiste en la réaction du radical alkyle avec $^3\text{O}_2$ pour former un radical peroxyde (LOO•). La **terminaison** permet la formation d'espèces non radicalaires (LOOL, LOOH : Esterbauer et al., 1991; Ayala et al., 2014). La lipoperoxydation conduit donc à la formation d'hydroperoxydes lipidiques (LOOH) qui se décomposent rapidement pour donner de nombreux produits secondaires tels que les radicaux libres lipidiques qui contribuent à l'oxydation des protéines, des acides nucléiques et d'autres lipides. De plus, la décomposition du LOOH produit des aldéhydes dont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-Hydroxynonéal (4-HNE) mais également des cétones, des alcanes, des isoprostanes et des époxydes (dont les produits d'oxydation du cholestérol ; Niki, 2014; Spickett et Pitt, 2015).

L'oxydation lipidique peut également être catalysée par des enzymes, notamment les lipoxygénases (LOXs) mais également les COXs (Laneville et al., 1995) et les cytochromes P 450 (CYP450). Par exemple, la 5-LOX dont l'activité est hautement régulée, oxyde l'acide arachidonique au niveau du

carbone 5 pour former de l'acide 5-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque ou 5-HPETE (Rådmark et al., 2007, 2015). La 5-LOX est notamment régulée par la concentration calcique et de nombreuses protéines kinases (Rådmark et al., 2015). La 12/15 LOX-synthétise le 12/15-HPETE également à partir de l'acide arachidonique mais également le 9/13-HPODE (L'acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque) à partir de l'acide linoléique (Dobrian et al., 2011).

Les conséquences de ces modifications des lipides sur les membranes sont importantes, avec des altérations de leurs compositions, structures, dynamiques et fonctions pouvant induire la mort cellulaire (Borst et al., 2000; Diaz et al., 2016; Wong-Ekkabut et al., 2007). En outre, les aldéhydes (MDA et 4-HNE) produits par peroxydation lipidique sont toxiques pour les cellules. Ces aldéhydes sont hautement réactifs, et peuvent réagir sur les amines primaires des protéines, les lipides ou l'ADN (Esterbauer et al., 1991; K. Kaur et al., 1997)

4.3) Oxydation des acides nucléiques

L'oxydation, l'hydrolyse et la méthylation de l'ADN contribue grandement à l'instabilité et à la dégradation du génome. Parmi les bases de l'ADN, la guanine est la plus susceptible au stress oxydant. La lésion mutagène principale est la 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG) qui s'apparie avec l'adénine plutôt que la cytosine, générant ainsi des mutations par transversions après la réplication (Cadet et al., 2003; Dizdaroglu et al., 2002; Freudenthal et al., 2015; Li et al., 2018). L'accumulation de 8-OHdG provoque un dysfonctionnement mitochondrial et s'est révélée être oncogène (Leon et al., 2016). Les autres oxydations de l'ADN sont : la 5-hydroxycytidine, la 5-hydroxythymine, et la 8-hydroxyadénosine. De plus, l'oxydation de l'ADN peut affecter le ribose, ou rompre la liaison glycoside ou phosphate provoquant des ruptures monobrins ou double brins (Li et al., 2018). Les lésions de l'ADN sont l'une des principales conséquences du stress oxydant après une ischémie cérébrale, ces lésions débutent quelques minutes après l'ischémie et se poursuivent jusqu'à 6 mois (Cui et al., 2000; Li et al., 2011).

L'ARN est également sujet à l'oxydation et il a été rapporté que chez l'homme, les dommages oxydatifs des ARN sont plus abondants que ceux des ADN, et ont des conséquences sur les processus pathologiques (Poulsen et al., 2012). L'oxydation retrouvée au niveau des ARN est la même que pour l'ADN hormis la 5-hydroxyuridine (à la place de la 5-hydroxythymine) et la principale oxydation est également la 8-hydroxyguanine (Poulsen et al., 2012). Les ARNm oxydés sont reconnus par les ribosomes et entraînent un blocage et un dysfonctionnement du ribosome, suivi d'une diminution

des taux de protéines fonctionnelles ou la production de protéines tronquées induisant une agrégation protéique dans les cellules.

De plus, l'oxydation touche également des micro-ARN (ARN non codants de 18 à 25 nucléotides qui se lient aux ARNm cibles au niveau du 3'-UTR et affectent la dégradation de l'ARNm ou inhibent leur traduction en protéines). Par exemple, l'oxydation du micro-ARN-184 lui permet de cibler l'ARNm de Bcl-xL et Bcl-w qui ne sont pas ses cibles originelles, provoquant une initiation de l'apoptose sur une lignée de cellules cardiaques (Wang et al., 2015).

4.4) Glucides

Les relations entre les glucides et le stress oxydant sont multiples : les dommages oxydants des sucres des acides nucléiques provoquent des ruptures de brin, les glucides libres génèrent des oxydants tels que des radicaux carbonyles (Robertson, 2004), la glycosylation non enzymatique, stade initial de la réaction de Maillard, génère des produits de glycoxydation qui s'accumulent dans les tissus (Monnier and Cerami, 1981).

5) Stress oxydant et ischémie cérébrale

5.1) Origine du stress oxydant au cours de l'ischémie cérébrale

De nombreux mécanismes sont à l'origine du stress oxydant à la suite d'une ischémie cérébrale. Le rôle de l'excitotoxicité est prépondérant dans l'induction du stress oxydant. Par la suite, d'autres événements participent au stress oxydant dont le dysfonctionnement mitochondrial, l'activation de diverses enzymes et la neuroinflammation.

5.1.1) Excitotoxicité

Comme évoqué précédemment, l'ischémie cérébrale entraîne une déplétion rapide en ATP et une incapacité à maintenir les gradients ioniques. Cette perturbation du potentiel membranaire a pour conséquence la dépolarisation des neurones et des cellules gliales qui libèrent du glutamate, neurotransmetteur excitateur majoritaire du cerveau, et aussi l'aspartate. Les processus de

recapture de ces acides aminés étant moins efficaces du fait de la déplétion énergétique, il en résulte une accumulation massive de glutamate dans l'espace extracellulaire, qui conduit à des phénomènes délétères regroupés sous le terme d'« excitotoxicité » (Figure 9 ; Wyatt et al., 1989; Katsura et al., 1994; Martin et al., 1994; Mehta et al., 2007; Krnjević, 2008; Karaszewski et al., 2009; Kostandy, 2012; Rama et García, 2016; Sun et al., 2019). La figure 9 résume l'induction de l'excitotoxicité dans l'ischémie.

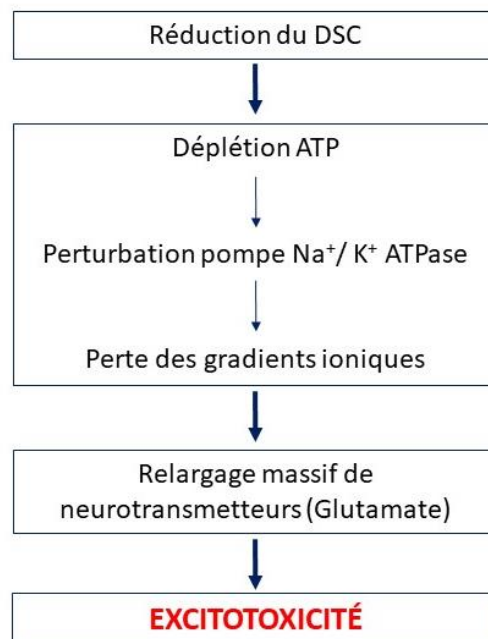


Figure 9 : Induction de l'excitotoxicité dans l'AVC ischémique.

D'après Rama et García, 2016.

Le glutamate active ensuite ses récepteurs de type NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et AMPA (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4propionate*), mais également les récepteurs kaïnate et métabotropiques (mGlu ; Figure 10 ; Mayo et al., 2012; Amantea et Bagetta, 2017; Sun et al., 2019) qui augmentent l'excitabilité neuronale en modulant les récepteurs NMDA et AMPA (Baudry et al., 2012). L'activation de ces récepteurs conduit à une surcharge d'ions Ca²⁺ et Na⁺ (Figure 10 ; Park et al., 1989; Berdichevsky et al., 1983; Liu et al., 2006; Peng et al., 2006).

Le manque d'ATP affecte la pompe Na⁺/K⁺-ATPase produisant une dépolarisation membranaire, une sortie de K⁺ et l'entrée de Na⁺ (Siesjö et al., 1989; Manzoor, 2014; Khoshnam et al., 2017). L'augmentation des concentrations de Ca²⁺ est accentuée par d'autres organites intracellulaire dont la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Manzoor, 2014). La forte concentration en Na⁺

perturbe l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (Bano and Nicotera, 2007) exprimée dans la membrane plasmique, les mitochondries et le réticulum endoplasmique limitant l'élimination de Ca^{2+} (Manzoor, 2014). De plus, l' IP_3 dissous dans le cytosol diffuse jusqu'à atteindre ses récepteurs, sur lesquels il agit pour accroître la concentration intracellulaire en cations Ca^{2+} (Doyle et al., 2008). L' IP_3 soluble résulte de l'hydrolyse par la phospholipase du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂), un phospholipide de la membrane plasmique. La déplétion énergétique conduit également à une perturbation de la pompe calcique (Ca^{2+} - ATPase) qui participe à l'augmentation dramatique de la concentration calcique intracellulaire (Doyle et al., 2008).

Cette forte concentration de calcium intracellulaire interfère avec de nombreuses réactions enzymatiques (dont l'activation des lipases, des protéases, des endonucléases, des phospholipases et la production de radicaux libres comme sous-produits de la synthèse des xanthines et des prostaglandines) et contribue à la libération de cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation (Figure 10, (Siesjö et al., 1989; Becker, 1998). L'activation d'enzymes protéolytiques par le calcium aboutit de plus à une dégradation des protéines du cytosquelette telles que l'actine et la spectrine (Furukawa et al., 1997) ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire comme la laminine (Chen ZL et al., 1997 Cell). D'autres protéines de signalisation de la mort cellulaire, telles que les calpaïnes (famille de protéases cystéines activées par le calcium) jouent également un rôle majeur dans la transformation de l'afflux calcique en dommages neuronaux (Zhou et Baudry, 2006; DeRidder et al., 2006; Koumura et al., 2008; López-Menéndez et al., 2009).

De plus, la perturbation de l'homéostasie cellulaire (*via* pompe Na^+ / K^+ ATPase ; Ca^{2+} - ATPase) entraîne une diffusion de l'eau par osmose dans les cellules, provoquant ainsi un gonflement rapide des neurones et des cellules gliales et un œdème cytotoxique. Cet œdème peut affecter la perfusion des régions autour du cœur de l'AVC, mais également induire des effets à distance du fait de l'augmentation de la pression intracrânienne ou de la compression vasculaire.

Dans l'ensemble, ces données soulignent d'une part le rôle délétère de l'excitotoxicité mais également le lien entre l'excitotoxicité et l'induction du stress oxydant (résumé dans la Figure 10). La production de radicaux libres suivant l'excitotoxicité est principalement induit par la mitochondrie et l'activation des enzymes tel que la NOX, COX, LOX et NOS (Brennan et al., 2009 ; Girouard et al., 2009b).

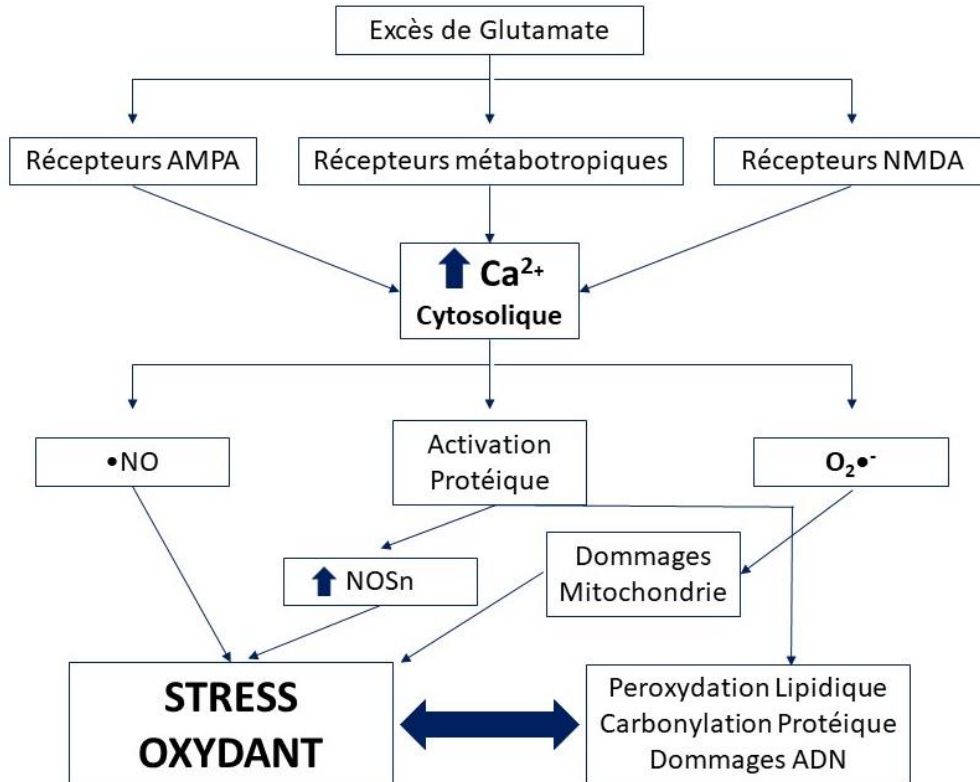


Figure 10 : Lien entre l'excitotoxicité et le stress oxydant dans l'AVC ischémique.

D'après Rama et García, 2016.

5.1.2) Dysfonctionnement mitochondrial

La mitochondrie produit l' $O_2\bullet^-$ qui est converti en H_2O_2 par la SOD et quitte la mitochondrie pour agir en tant que messager intracellulaire au niveau du SNC et SNP (Rice, 2011).

En condition ischémique, la déplétion en O_2 intervient avant celle en glucose, ce qui favorise la glycolyse et une métabolisation anaérobie (Liu et al., 2004). La voie glycolytique entraîne une accumulation d'acide lactique et de H^+ dans les mitochondries, une inversion de l'uniport H^+ de la membrane mitochondriale, et en conséquence une accumulation de H^+ intracellulaire (Ying et al., 1999). L'acidose contribue au stress oxydant en fournissant des ions H^+ pour la conversion de $O_2\bullet^-$ en H_2O_2 ou $OH\bullet$ (Saeed et al., 2007). De plus, l'appauvrissement en O_2 contribue à la formation d' $ONOO^-$ (Nicholls, 2008).

Des études ont démontré l'importance du complexe I de la chaîne de transport d'électron (ETC), comme point d'entrée des électrons du NADH dans la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) à la suite de l'ischémie (Chouchani et al., 2013; Niatsetskaya et al., 2012). Une inhibition du complexe I

(par le pyridabène) chez des souris néonatales entraîne une diminution de la production d'ERO et une réduction du volume de l'infarctus (Dröse et al., 2016; Niatsetskaya et al., 2012).

Paradoxe bien documenté lors de l'AVC, la reperfusion du cerveau ischémié provoque des effets délétères au niveau cellulaire, notamment une augmentation importante de la production d'ERO (Peters et al., 1998; Yamato et al., 2003). La récupération de la chaîne respiratoire mitochondriale après le retour du flux sanguin cérébral provoque un pic dans la production d'ERO mitochondriale, notamment la réactivation du complexe I de la CRM et la surproduction d'O₂•- qui en résulte (Chen et al., 2008; Dröse et al., 2016).

5.1.3) Activation des enzymes produisant des espèces réactives : cyclooxygénases, lipoxygénases, xanthine oxydoréductase, NADPH-oxydases et NO-synthases (NOS)

La **COX-1** est constitutivement exprimée dans de nombreux types de cellules dont la microglie et les leucocytes durant l'ischémie (Schwab et al., 2002). Des souris KO COX-1 ont une vulnérabilité à l'ischémie cérébrale (Iadecola et al., 2001) et la COX-1 réduit le volume de l'infarctus cérébral en augmentant le taux de prostacycline et en supprimant la production de leucotriènes (Lin et al., 2002).

Une régulation positive de l'ARNm et de la protéine **COX-2** dans l'hémisphère ischémié commence 6h après l'ischémie et atteint un pic entre 12 et 24h ce qui suggère une production d'espèces réactives tardive (Nogawa et al., 1997). Sur des patients ayant subi une ischémie, la COX-2 est surexprimée dans les régions ischémiées mais aussi dans les régions non ischémiées (Iadecola et al., 1999). De plus, une inhibition de la COX-2 ou des souris KO COX-2 réduit la taille de l'infarctus et améliore les résultats fonctionnels (Nogawa et al., 1997; Iadecola et al., 2001; Sugimoto et Iadecola, 2003). A l'inverse, une surexpression de COX-2 augmente les lésions ischémiques (Doré et al., 2003).

Dans un modèle d'hémorragie sous-arachnoïdienne, l'expression de la **12/15 LOX** est augmentée dans les macrophages du parenchyme cérébral (Gaberel et al., 2019). De plus, un inhibiteur de 12/15 LOX (ML351) et un modèle murin de KO LOX-15 permet de réduire la mortalité cellulaire et l'œdème cérébral (Gaberel et al., 2019). Le même inhibiteur de la **12/15 LOX** (le ML351) a permis de réduire la taille de l'infarctus et le risque de transformation hémorragique dans un modèle d'ischémie (Liu et al., 2017). Enfin, un autre inhibiteur de la **12/15 LOX** (LOXBlock-1) a réduit le volume de l'infarctus (Karatat et al., 2018). La **5-LOX** est également impliquée dans l'ischémie cérébrale, son métabolite le 5-HETE est métabolisé en leucotriène A4 (LTA4), un précurseur des cysteinyl leucotriènes (cysLTs), et en LTC4 qui est impliqué dans la perturbation de la BHE (Rao et al., 1999). La 5-LOX est augmentée

dans le cerveau de patients ayant subi une ischémie (Tomimoto et al., 2002). De plus, dans un modèle d'ischémie, un inhibiteur de 5-LOX diminue la mortalité cellulaire, le volume de l'œdème, la taille de l'infarctus et l'inflammation (Baskaya et al., 1996; Shi et al., 2013; Silva et al., 2015; Tu et al., 2016).

Au cours de l'ischémie, l'ATP est catabolisé en hypoxanthine qui s'accumule dans le tissu ischémique et la XDH est clivée en **XO** (Abramov et al., 2007). Pendant la phase de reperfusion, la XO peut alors oxyder l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique en produisant $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 (Parks and Granger, 1986). Les données cliniques démontrent qu'un inhibiteur de la **XO** améliore les fonctions endothéliales et vasculaires, les marqueurs de l'inflammation, le score modifié de Rankin et réduit les handicaps suite à un AVC (Britnell et al., 2018).

Les NOX sont activées durant l'ischémie, dont la NOX 1, 2 et 4 (Ma et al., 2017), et participent à la production d'ERO (Bedard et Krause, 2007; Chen et al., 2009; Zhang et al., 2009, 2012). Parmi les 7 types de NOX, la NOX 2 connue pour produire l' $O_2^{\bullet-}$ et la NOX 4 produisant l' H_2O_2 (Drummond and Sobey, 2014; Ma et al., 2017; Serrander et al., 2007) sont surrégulées après l'ischémie (McCann et al., 2008; Yoshioka et al., 2011; McCann et al., 2014; Ma et al., 2017). L'expression de la NOX2 est augmentée d'un facteur 6 à 7, principalement dans les neurones et les cellules endothéliales à un temps précoce (3-6h) puis dans la microglie (72h; Zhang et al., 2009; Zhang et Chopp, 2009; Yoshioka et al., 2011) mais également dans les astrocytes (De Silva et al., 2011). L'expression de la NOX4 est également augmentée dans les neurones, la microglie, les astrocytes et les cellules endothéliales après l'ischémie (De Silva et al., 2011; Kleinschnitz et al., 2010). D'autres études ont également démontré une augmentation des taux d'ARNm et de protéines des NOX 2 et 4 entre 2h et 48h après la reperfusion (Hong et al., 2006; Li et al., 2014; Zhang et al., 2015; Liu et al., 2015) et une étude mis en évidence une expression protéique marquée de la NOX 2 jusqu'à 2 semaines après l'ischémie (Choi et al., 2015a). Concernant la NOX 1, une augmentation de l'expression a été observé entre 1 jour à deux semaines après l'ischémie (Choi et al., 2015a).

Les **NO-synthases** sont fortement activées durant l'hypoxie, l'ischémie et la reperfusion (Girouard et al., 2009; Brennan et al., 2009; Förstermann, 2010; Chen et al., 2017). Elle représente une source importante de production d'ERO après une ischémie cérébrale, plus particulièrement lors de la reperfusion (Chen et al., 2009), par notamment la production de grandes quantités de **NO**, délétère pour le parenchyme cérébral (Bath et al., 2017; Liu et al., 2015). Lorsqu'il est combiné avec $O_2^{\bullet-}$, le NO génère un radical hautement réactif : l'anion peroxy-nitrite ($ONOO^-$) qui active la peroxydation lipidique et d'autres lésions tissulaires (Beckman et Koppenol, 1996; Iadecola, 1997; Doyle et al., 2008). Une inhibition de la NOSn ou de la NOSi diminue la production de nitrotyrosine, un marqueur

de production d'anions peroxy-nitrites, et réduit le volume de l'infarctus (Eliasson et al., 1999; Hirabayashi et al., 1999, 2000; Parmentier-Batteur et al., 2001; Takizawa et al., 1999). A l'inverse, la NOSe joue un rôle protecteur en maintenant le débit sanguin cérébral et en inhibant l'adhésion des leucocytes et des plaquettes (Liu et al., 2015b).

Les ERN ont d'importants effets sur la cellule, tels que l'ouverture des pores de la mitochondrie (mPTP), l'inhibition d'enzymes mitochondriales, les lésions de l'ADN, et l'activation des canaux TRPM7 (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7) perméables au calcium (Aarts et Tymianski, 2005; Pacher et al., 2007). Le NO modifie également des protéines par des altérations post-traductionnelles dont les caspases, les MMP et la GAPDH (D-glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), ce qui affecte la survie cellulaire (Gu et al., 2002; Nakamura et al., 2013).

5.1.4) Neuroinflammation

Quelques minutes après la survenue de l'ischémie cérébrale, la cascade inflammatoire est déclenchée (Iadecola et Anrather, 2011; De Meyer et al., 2016). La microglie, les astrocytes, les cellules endothéliales et les neurones libèrent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β (Interleukine 1 β ; Buttini et al., 1994; Boutin et al., 2001; Lambertsen et al., 2012) et le TNF α (Tumor necrosis factor ; Yoshimoto et al., 1997; Offner et al., 2006; Liu et al., 1994; Mastorakos et McGavern ,2019) qui permettent entre autres le recrutement, l'activation et l'adhérence des **leucocytes** sur l'endothélium vasculaire, puis leur infiltration au sein du parenchyme cérébral (Kriz, 2006; Mastorakos et McGavern, 2019).

Les **polynucléaires neutrophiles (PMN)** contribuent à générer des ERN et sont les premières cellules périphériques à être recrutées dans le parenchyme (Beray-Berthat et al., 2003; Forster et al., 1999; Garcia-Bonilla et al., 2014). La production des espèces réactives par les PMN est réalisée par 2 enzymes : la myéloperoxydase (qui produit l'acide hypochloreux) et la NOX (qui produit les O₂•⁻). Après une ischémie cérébrale, la déplétion en PMN est associée à une diminution des niveaux de radicaux (Matsuo et al., 1995). De plus, le traitement par des anticorps anti-CD18, une molécule d'adhérence nécessaire à l'infiltration des PMN, réduit la production d'O₂•⁻ post-ischémique (Fabian and Kent, 1999).

La **microglie** représente les macrophages résidents du SNC (Kreutzberg, 1996). Au cours de l'ischémie la microglie s'active et subit d'importantes transformations morphologiques, métaboliques et génétiques (Wood, 1995; Hoehn et al., 2005; Szalay et al., 2016). Par la suite, elle devient

phagocytaire et se transforme en principale source de production et de libération de médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines mais également de molécules toxiques comme les prostanoïdes, et les ERON (Gregersen et al., 2000; Lucas et al., 2006; Mrak and Griffin, 2005).

Les **astrocytes** sont également activés après l'ischémie (Liu et Chopp, 2016) et peuvent également libérer du NO (Dong et Benveniste, 2001; Swanson et al., 2004). De plus, le gonflement des astrocytes induit une augmentation de la pression intracrânienne, une réduction de la perfusion vasculaire et une exacerbation des lésions ischémiques (Kimmelberg, 2005; Liu et Chopp, 2016).

5.2) Mise en évidence du stress oxydant au cours d'une ischémie cérébrale

Les espèces réactives peuvent être directement détectées dans les tissus cérébraux mais leur très faible concentration et leur demi-vie très courte les rendent difficiles à mesurer. Ainsi, dans la plupart des études, leur production est évaluée par des techniques indirectes comme par la mesure des dommages provoqués aux macromolécules biologiques, ou à la consommation d'antioxydants endogènes.

5.2.1) Dans les modèles animaux

L'évaluation des systèmes antioxydants endogènes ou des molécules oxydées dans les tissus cérébraux révèle un stress oxydant précoce entre 30 et 60 minutes après une ischémie. Ce stress oxydant est caractérisé par une baisse des concentrations en GSH (Uemura et al., 1991), vitamine C (Flamm et al., 1978), vitamine E et ubiquinol-10 (Kinuta et al., 1989) mais également une augmentation du MDA, reflet d'une oxydation lipidique (Serteser et al., 2002). Une augmentation marquée des taux d'acide urique dans le cerveau a également été observée dans les premières heures qui ont suivi une ischémie permanente chez le rat (Uemura et al., 1991), concordant avec une diminution de xanthine, ces résultats pouvant refléter la transformation de la xanthine en acide urique au cours de l'ischémie, et la production d' $O_2^{\bullet-}$ qui en découle. Des études ont également démontré une production immédiate et importante de radicaux HO^{\bullet} (Kato et al., 2003a; Lancelot et al., 1995) et d' $O_2^{\bullet-}$ après l'ischémie (Fabian et al., 1995; Fabian et Kent, 1999). La production de radicaux libres persiste plusieurs heures après une ischémie (Flamm et al., 1978; Kinuta et al., 1989) et jusqu'à 21 jours (Uemura et al., 1991).

Après la reperfusion, la production de radicaux libres, en particulier celle d'O₂•⁻, augmente considérablement dans les tissus endommagés (Fabian et al., 1995). D'autres études ont rapporté une augmentation du taux de radicaux hydroxyles (Kato et al., 2003a; Lancelot et al., 1995), ou une baisse de GSH au cours de la reperfusion post-ischémique (Choi-Kwon et al., 2004). Concernant les enzymes antioxydantes, une diminution significative de la catalase a été mise en évidence au début de la reperfusion ainsi qu'une diminution de la GPx 48h plus tard (Lerouet et al., 2002). L'activité de la SOD semble décliner au début de la reperfusion (Lerouet et al., 2002) bien qu'une étude rapporte une augmentation de son activité dans la pénombre (Toyoda and Lee, 1997)

5.2.2) En clinique

Différentes études ont mis en évidence en clinique une augmentation post-ischémique de la peroxydation lipidique, grâce à des marqueurs tels que les TBARS (les substances réactives à l'acide thiobarbiturique ; Chang et al., 1998; El Kossi et Zakhary, 2000; Alexandrova et al., 2004), le MDA (Sharpe et al., 1994; Demirkaya et al., 2001) et les peroxydes de lipides (LOOH ; Polidori et al., 1998; Alexandrova et al., 2004). Les niveaux plasmatiques des antioxydants tels que la vitamine C (Sharpe et al., 1994; Cherubini et al., 2000; El Kossi et Zakhary, 2000), la vitamine E (Chang et al., 1998), la vitamine A et l'acide urique (Cherubini et al., 2000) sont également plus faibles chez les patients victimes d'ischémie cérébrale. Une étude a également rapporté une augmentation des taux sériques de MDA et une diminution de l'activité catalase sans diminution de l'activité GPx et SOD dans les 24 heures. Les activités SOD et CAT étaient néanmoins diminuées au 5^{ème} jour post-AVC (Milanlioglu et al., 2016).

Ces marqueurs de stress oxydant semblent être de bons marqueurs pronostiques. Différentes études ont rapporté que les lésions cérébrales et le déficit neurologique étaient positivement corrélés avec les concentrations de SOD 1 et 3 dans le liquide céphalo-rachidien (LCR ; Strand, 1992), de LOOH dans le plasma (Polidori et al., 1998), de MDA et TBARS dans les érythrocytes (Demirkaya et al., 2001; Polidori et al., 1998) ainsi qu'avec les taux de radicaux libres produits par les phagocytes périphériques (Alexandrova et al., 2004), et à l'inverse, négativement corrélés aux concentrations plasmatiques de vitamine C, E (Leinonen et al., 2000), d'acide urique (Chamorro et al., 2002), à l'activité antioxydante totale du plasma (Leinonen et al., 2000), à l'activité SOD plasmatique (Spranger et al., 1997) ou érythrocytaire (Demirkaya et al., 2001) ainsi qu'à l'activité GPx dans les érythrocytes (Demirkaya et al., 2001).

Le stress oxydant post-ischémique mis en évidence aussi bien dans les études cliniques que précliniques est à l'origine de lésions cellulaires *via* les différents mécanismes exposés précédemment (4 – Rôle délétères des ERONS). Les nanoparticules d'oxyde de cérium que nous avons développées étant destinées à cibler l'endothélium vasculaire afin d'y réduire les dommages liés au stress oxydant, ces dommages seront détaillés plus spécifiquement dans le chapitre suivant.

5.3) Conséquences vasculaires du stress oxydant au cours de l'ischémie cérébrale

Plusieurs mécanismes sont à l'origine des effets délétères du stress oxydant au niveau des vaisseaux : une vasoconstriction, une agrégation plaquettaire, une augmentation de la perméabilité endothéliale et des lésions des cellules endothéliales (Seal et Gewertz, 2005; Cai Hua et Harrison David, 2000; Faraci, 2006; Sierra et al., 2011). Au sein des cellules endothéliales, la diminution de la disponibilité du NO entraîne une vasoconstriction, réduisant encore le flux sanguin et contribuant à l'agrégation des plaquettes et l'adhésion des leucocytes (Cai Hua, 2000 *Circ Res* ; Seal JB, 2005 *Basic Science Res*). De plus, le stress oxydant dans les péricytes (cellules contractiles des capillaires) entraîne une constriction du système microvasculaire (Atochin et al., 2007; Sierra et al., 2011). Les cytokines pro-inflammatoires entraînent une cascade de coagulation, qui occlut les capillaires et induit le phénomène de «no reflow » (Seal and Gewertz, 2005). Enfin, le facteur de transcription NF- κ B (Facteur nucléaire kappa B) induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de MMP qui augmentent la perméabilité de la BHE et augmentent le risque de transformation hémorragique.

Dans un premier temps, ce chapitre détaillera l'inflammation vasculaire après l'ischémie cérébrale puis les perturbations de la BHE et enfin, les transformations hémorragiques.

5.3.1) Inflammation vasculaire

Le stress oxydant active des facteurs de transcriptions dont NF- κ B et MAPK (Mitogen-activated protein kinases ; Buelna-Chontal et Zazueta, 2013; Kawabori et Yenari, 2015). NF- κ B est largement associé à l'initiation de la réponse inflammatoire (Kawabori et Yenari, 2015) alors que MAPK régule la réponse inflammatoire (Barone et Feuerstein, 1999; Irving et Bamford, 2002).

A la suite de l'ischémie cérébrale, une réaction inflammatoire se produit notamment à l'interface des cellules endothéliales et des microvaisseaux sanguins (Figure 11 ; Tănăsescu et al., 2008). La

libération de cytokines (dont l'IL-1 β et le TNF α) entraîne le recrutement, l'activation et l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium vasculaire cérébral, ces cellules migrent ensuite vers la zone de l'infarctus (Figure 11 ; Sughrue et al., 2004). Cette transmigration des leucocytes dans le parenchyme cérébral nécessite l'expression de molécules d'adhérence cellulaire (CAM – Cellular Adhesion Molecules); cette expression des CAM est augmentée dans des modèles animaux d'ischémie cérébrale (Okada et al., 1994; Stoll et al., 1998; Frijns et Kappelle, 2002; McEver et Zhu, 2010).

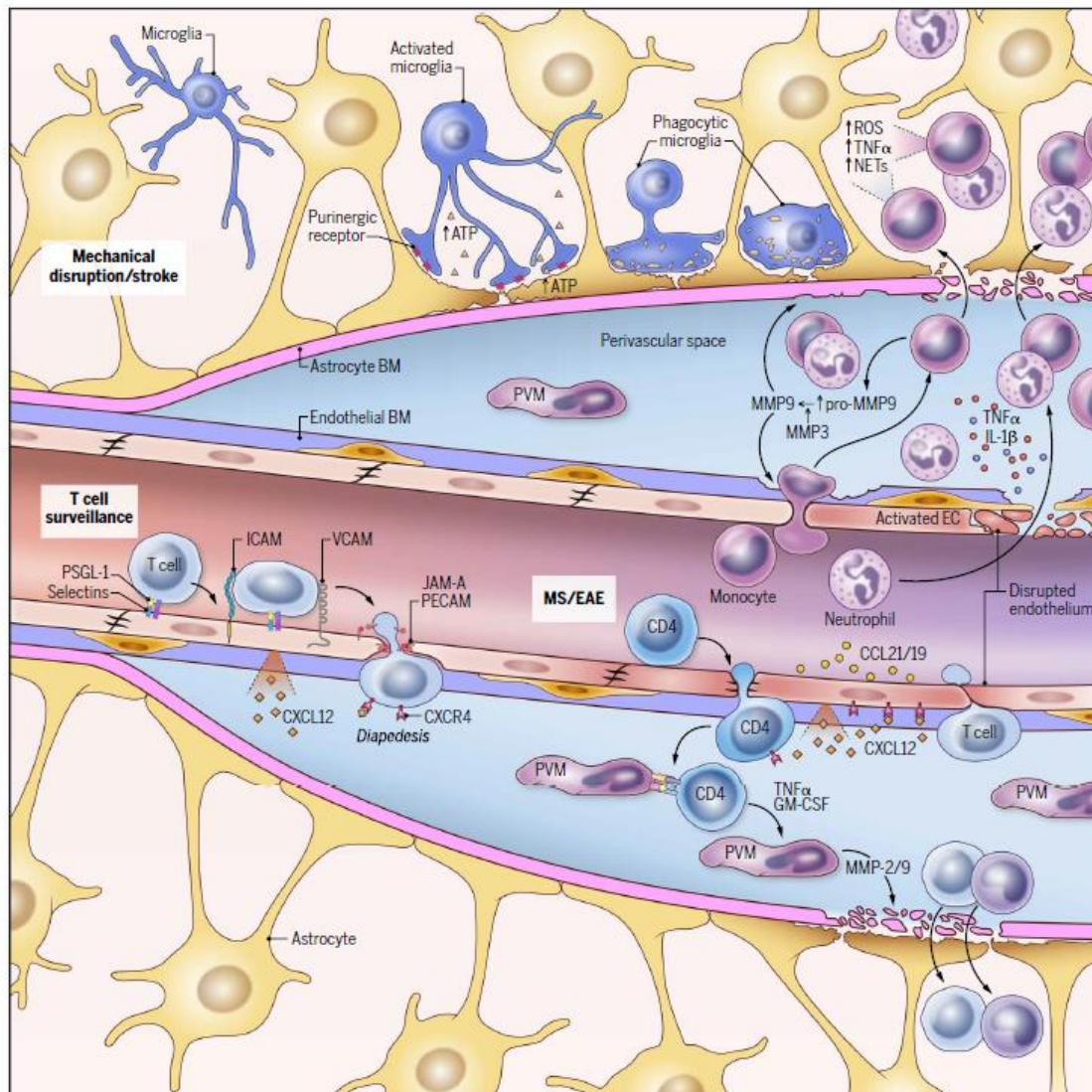


Figure 11 : Inflammation vasculaire.

Abréviations : ROS : Espèce réactive de l'oxygène ; TNF α : Facteur de nécrose tumorale ; NETs : Pièges de neutrophiles ; extracellulaire ; ATP : Adénosine triphosphate ; BM : Membrane Basale ; PVM : Macrophages périvasculaires ; MMP : Métalloprotéases matricielles ; IL : Interleukine ; EC : Cellules endothéliales ; PSGL-1 : Ligand-1 de glycoprotéine de P-selectine ; T cells : Lymphocyte T ; ICAM : Molécule d'adhésion intracellulaire ; VCAM : Molécule d'adhésion vasculaire ; JAM-A : Molécule d'adhésion jonctionnelle A ; PECAM : Molécule d'adhésion des cellules endothéliales et plaquettes ; CXCL : Ligand de chimiokine de motif C-X-C ; CXCR : Récepteurs de chimiokine CXC ; MS :

Sclérose en plaque ; EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale ; **CD-4** : Cluster de différenciation 4 exprimée sur les lymphocytes CD⁴⁺ ; **CCL** : Ligand de chimiokine de motif C-C ; **GM-CSF** : Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages. D'après Mastorakos et McGavern, 2019.

5.3.1.1) Molécules d'Adhérence Cellulaire (CAM) et infiltration leucocytaire

Les molécules d'adhérence cellulaire appartiennent à **trois principaux groupes** (Brevetti et al., 2006; DeGraba, 1998; Emsley and Tyrrell, 2002; Supanc et al., 2011): les sélectines, les intégrines et la superfamille des immunoglobulines.

- **Les sélectines**

La famille des sélectines comprend trois molécules d'adhésion : la P-sélectine, la E-sélectine et la L-sélectine (Carlos and Harlan, 1994; Hallenbeck, 1996; McEver, 2015). La lettre désigne le type cellulaire sur lequel la molécule a été identifiée pour la première fois (Plaquettes, Endothélium et Leucocytes).

- **Les intégrines**

Les intégrines sont des hétérodimères constitués de deux sous-unités α et β . Elles forment une large famille de glycoprotéines transmembranaires classées en fonction de leur sous-unité β : intégrines $\beta 1$ à $\beta 8$ (Huang et al., 2006; Hood et Cheresch, 2002; Barczyk et al., 2010; Kechagia et al., 2019). Elles sont exprimées par les leucocytes.

- **La superfamille des immunoglobulines**

ICAM-1 (IntraCellular Adhesion Molecule ou CD 45) est exprimée constitutivement sur les cellules endothéliales, les leucocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales. Son expression est inducible notamment par les cytokines IL-1 β et TNF et par le LPS. **ICAM-2** (ou CD 102) est exprimée sur les plaquettes et les cellules endothéliales de façon constitutive (Ramos et al., 2014).

VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule ou CD 106) est exprimée physiologiquement par les cellules endothéliales et son expression peut être augmentée par des médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β , le TNF α et le LPS (Kong et al., 2018).

PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 ou CD 131) est exprimée par les cellules endothéliales, les leucocytes et les plaquettes (Lertkiatmongkol et al., 2016).

MAdCAM-1 (Mucosal Vascular Addressing Cell Adhesion Molecule-1) est exprimée sur l'endothélium des muqueuses.

L'**infiltration leucocytaire** se réalise en quatre étapes : capture, roulement, adhérence et migration (Figure 12).

La **capture** correspond à la phase de recrutement des leucocytes. Les cytokines induisent l'activation de l'endothélium et augmentent l'expression de la P- et de la E-sélectines. La L-sélectine leucocytaire se fixe sur les P- et E-sélectines de l'endothélium.

Au cours du **roulement**, les leucocytes se déplacent le long de la paroi vasculaire par des liaisons de basse affinité, jusqu'à la phase d'adhérence.

La phase d'**adhérence** correspond au passage de l'adhérence faible impliquant les sélectines (capture et roulement) à une phase d'adhérence forte. Cette adhérence forte est réalisée grâce aux intégrines leucocytaires et aux immunoglobulines de l'endothélium telles qu'ICAM-1 et VCAM-1.

La **migration** des leucocytes à travers l'endothélium est régie par PECAM qui est exprimée à la fois par l'endothélium et les leucocytes. La migration est principalement paracellulaire, les leucocytes traversant la BHE *via* les jonctions intercellulaires mais il n'est pas exclu que les leucocytes puissent également passer par une voie transcellulaire (Carman and Springer, 2008; Carman et al., 2007; Dejana, 2006).

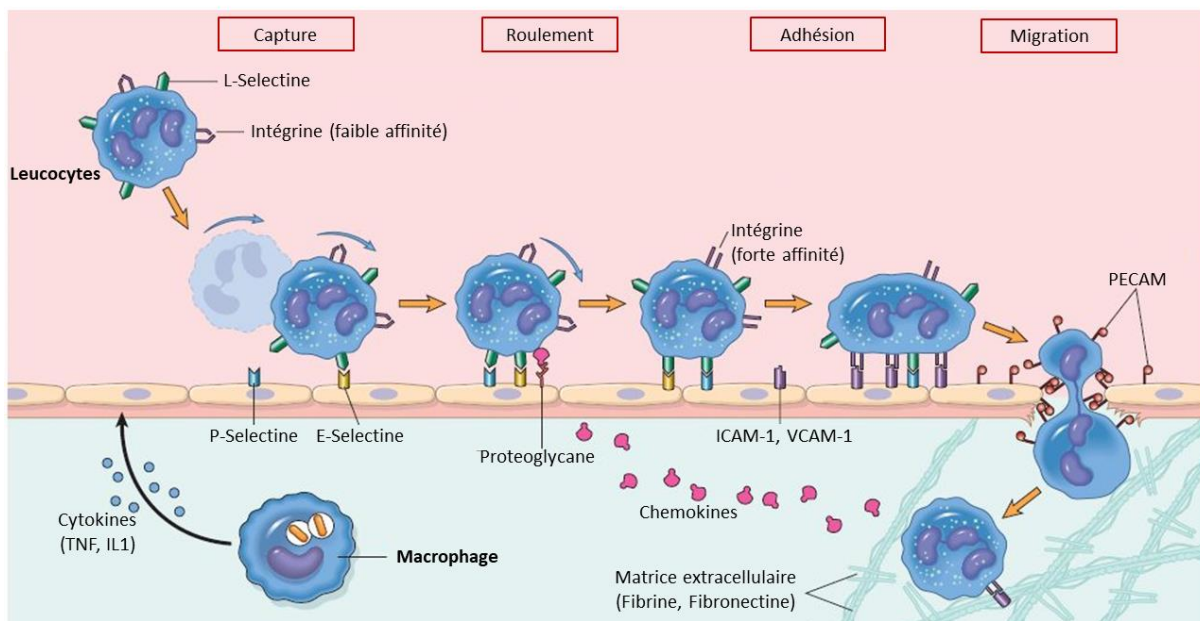


Figure 12 : Transmigration des leucocytes.

Abréviations : **ICAM** : Molécule d'adhésion intracellulaire ; **VCAM** : Molécule d'adhésion vasculaire ; **PECAM** : Molécule d'adhésion des cellules endothéliales ; **TNF α** : Facteur de nécrose tumorale ; **IL** : Interleukine ; **L/ P/ E- Selectine** : Leucocytaires, Plaquettaires et Endothéliales. D'après Lagarrigue et al., 2016.

5.3.1.2) Focus sur VCAM-1, cible de nos nanoparticules

5.3.1.2.1) Généralités

VCAM-1 (ou CD106) est une glycoprotéine inducible de 90 kDa principalement exprimée par les cellules endothéliales.

Elle a été identifiée pour la première fois en 1989 en tant que glycoprotéine de surface des cellules endothéliales (Osborn et al., 1989; Rice et Bevilacqua, 1989). Différentes études ont mis en évidence une augmentation de VCAM-1 dans de nombreuses pathologies liées à l'inflammation dont l'athérosclérose (Cybulsky et al., 2001; Fotis et al., 2012; Jang et al., 2017), la polyarthrite rhumatoïde, les cancers (Kong et al., 2018), la maladie d'Alzheimer (Ferretti et al., 2016; Hall et al., 2013; Huang et al., 2015), la sclérose en plaques (McAteer et al., 2007; Vercellino et al., 2017) et la maladie de Parkinson (Armentero et al., 2011; Herlofson et al., 2018).

L'expression de VCAM-1 est augmentée par divers agents pro-inflammatoires dont le LPS (Sawa et al., 2008; Rafiee et al., 2016; Lee et al., 2017), le TNF (Henseleit et al., 1994; Kim et al., 2007; Kwon et al., 2016; Yang et al., 2016), l'IL-1 β (Jang et al., 2017; McHale et al., 1999), mais également par les ERO, de fortes glycémies, les lipoprotéines de faible densité, les agonistes des récepteurs toll-like et le « shear stress » (Cook-Mills et al., 2011). De plus, l'activation de VCAM-1 est régulée par des facteurs de transcriptions tels que NF- κ B, SP-1 (Protéine de spécificité 1), Ap-1 (Protéine activatrice-1 ; Cook-Mills et al., 2011).

Lors d'inflammations aiguës ou chroniques de certaines pathologies, VCAM-1 peut également être exprimée à la surface de cellules autres que l'endothélium dont les macrophages tissulaires, les cellules dendritiques, les fibroblastes, les myoblastes et les cellules de Kupffer (Sharma et al., 2017).

Sur le plan structurel, VCAM-1 humain contient un domaine extracellulaire avec 6 ou 7 domaines analogues à l'immunoglobuline (Ig), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique alors que le VCAM-1 murin présente 3 ou 7 domaines extracellulaire analogues à l'Ig (Figure 13 ; Cook-Mills et al., 2011; Schlesinger et Bendas, 2015).

VCAM-1 est un important régulateur de l'adhérence leucocytaire et de la migration transendothéliale *via* son interaction avec les leucocytes (Cerutti and Ridley, 2017; Cook-Mills et al., 2011; Osborn et al., 1989) dont les monocytes (Huo et al., 2000), les mastocytes (Hallgren et al., 2007), les polynucléaires éosinophiles (Sagara et al., 1997), les lymphocytes T et les lymphocytes B (Ren et al., 2010).

Le domaine Ig-like 1 et/ou 4 de VCAM-1 est impliqué dans la liaison à des ligands dont l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (ou VLA-4 pour Very Late Antigen-4) et $\alpha 4\beta 7$ (Figure 13; Cook-Mills et al. 2011; Schlesinger et Bendas, 2015). Ces intégrines sont exprimées par les polynucléaires éosinophiles et basophiles, les lymphocytes, les mastocytes et les monocytes (Cook-Mills et al., 2011). L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ joue un rôle majeur dans le roulement et l'adhérence ferme des leucocytes (monocytes et lymphocytes) à l'endothélium ainsi que dans leur transmigration (Cerutti and Ridley, 2017). L'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est exprimée dans les lymphocytes T (DeNucci et al., 2010). De plus, dans les cellules dendritiques folliculaires, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ a été identifiée comme un ligand de VCAM-1 nécessaire à l'adhésion ferme des lymphocytes B (Freedman et al., 1990). La neutralisation de VCAM-1 par un anticorps ou l'utilisation de modèles murins KO VCAM-1 s'oppose à l'adhésion des leucocytes dont les macrophages et les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles à l'endothélium (Abonia et al., 2006). Enfin, les domaines de type Ig du domaine extracellulaire contiennent le site de N-glycosylation qui se lie à la galectine-3 sur les polynucléaires éosinophiles (Cook-Mills et al., 2011; Schlesinger et Bendas, 2015).

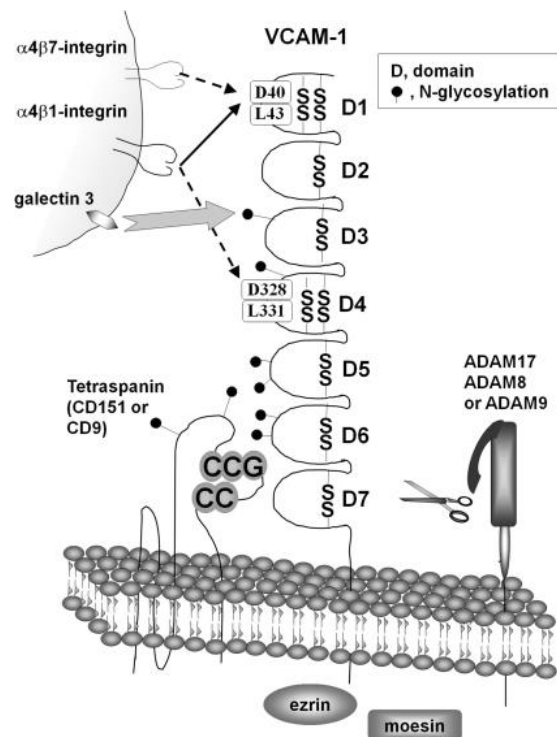


Figure 13 : Interaction de VCAM-1 avec VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), $\alpha 4\beta 7$ et galectine-3. D'après Cook-Mills et al., 2011.

5.3.1.2.2) VCAM-1 dans l'ischémie cérébrale

En clinique, la forme soluble de VCAM-1 a été détectée dans le sang et le LCR de patients victimes d'AVC (Figure 14; Nilupul Perera et al., 2006) ; elle augmente au cours des premiers jours suivant l'ischémie cérébrale (Nilupul Perera et al., 2006; Supanc et al., 2011) et les taux sont corrélés à la gravité de l'AVC (Danton and Dietrich, 2003). Cependant, une étude a démontré une augmentation de VCAM-1 soluble après une ischémie, sans lien avec la gravité de l'AVC (Supanc et al., 2011). L'augmentation de l'expression de VCAM-1 lors de l'AVC semble être plus importante que dans d'autres pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, sans doute du fait de sa forte composante vasculaire (Sotgiu et al., 2006). VCAM-1 a également été détectée dans le cerveau de patients autopsiés après une ischémie cérébrale (Cook-Mills et al., 2011).

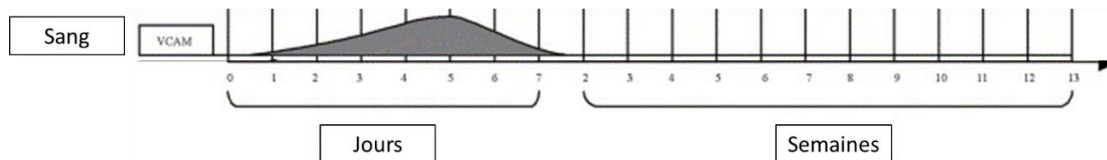


Figure 14 : Détection de la forme soluble de VCAM-1 dans le sang après une ischémie cérébrale. D'après Nilupul Perera et al., 2006.

Bien que la plupart des études démontre une augmentation de VCAM-1 après un AVC, une étude n'a montré aucune augmentation des taux sériques de VCAM-1 (ni d'ICAM-1) alors que les taux de P- et E-sélectines étaient augmentés (Cook-Mills et al., 2011).

Il a également été montré que le taux plasmatique de VCAM-1 est un marqueur prédictif des conséquences neurologiques de l'ischémie cérébrale. En effet, une diminution des taux plasmatiques de VCAM-1 dans les 4 premiers jours après un AVC est associée à une bonne récupération neurologique (Bloom et al., 2002). Une étude plus récente rapporte que les taux sériques de VCAM-1 au cours de la 3^{ème} semaine après la survenue de l'AVC est un facteur déterminant du pronostic à 3 mois (Richard et al., 2015). Enfin, l'étude MITICO réalisée sur 965 patients a permis de mettre en évidence que l'augmentation de VCAM-1 dans le sang de patients victimes d'une ischémie est prédictif de récurrences (Castillo et al., 2009). Cependant, une autre étude a rapporté une absence de corrélation entre les niveaux de VCAM-1 soluble (et d'ICAM-1) et la gravité de l'AVC et l'invalidité qui en découle (Supanc et al., 2011).

Dans des modèles animaux, une augmentation de VCAM-1 a été mise en évidence entre 4h et 24h après l'ischémie (Zhang et Wei, 2003; Fréchou et al., 2013).

L'étude du rôle de VCAM-1 dans l'ischémie cérébrale a donné lieu à des résultats contradictoires. Deux études ont mis en évidence un rôle délétère de VCAM-1, la première a démontré une réduction de la mort neuronale et des déficits neurologiques en inhibant partiellement l'augmentation de VCAM-1 induite par l'ischémie par un antagoniste des récepteurs leucotriène (ONO-1078 ; Zhang et Wei, 2003) et la seconde, sur un modèle KO VCAM-1, a démontré une réduction de l'infiltration des lymphocytes T et du volume de lésion (Liesz et al., 2011) Cependant, une autre étude n'a pas démontré d'amélioration avec un anticorps anti-VCAM (Justicia et al., 2006).

5.3.2) BHE et transformations hémorragiques

5.3.2.1) Perturbations de la BHE

La barrière hémato-encéphalique (BHE), qui sépare la circulation sanguine du parenchyme cérébral dans le SNC, est constituée de cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, d'une lame basale continue et de pieds astrocytaires (Figure 15 ; Mastorakos et McGavern, 2019). La BHE permet le passage par diffusion passive de l'H₂O, de certains gaz, de molécules liposolubles, le transport sélectif de molécules telles que le glucose et les acides aminés, tout en empêchant le passage d'agents pathogènes ou de neurotoxines (Grieb et al., 1985).

Au cours d'une ischémie cérébrale, les ERO générées par les cellules ischémisées du système vasculaire mais également libérées par les leucocytes adhérents dans la lumière des vaisseaux entraînent la dégradation de la BHE (Abdullahi et al., 2018; Sun et al., 2018; Yang et al., 2019; Bennett et al., 2019). L'H₂O₂ généré par les NADPH-Oxydase augmente la perméabilité de la BHE, via la redistribution et la dégradation des protéines de jonctions dont ZO-1 et l'occludine (Lee et al., 2004). La perturbation de la BHE est atténuée par l'utilisation de traitement antioxydant. Le TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) est un antioxydant perméable aux membranes qui présente des activités de type SOD qui induit une dégradation des anions superoxyde mais également des radicaux hydroxyles et carbonate (Abdullahi et al., 2018). Le TEMPOL traverse la BHE et induit une neuroprotection dans des modèles d'ischémie. De plus, le TEMPOL préserve la localisation de l'occludine et prévient sa dégradation (Lochhead et al., 2010).

Hormis un effet délétère direct, les ERO dont le NO et ONOO- agissent également sur les MMP, soit en les activant par oxydation, nitrosylation ou *via* des cytokines (TNF α ; IL1- β), soit en activant les

facteurs de transcription sensibles au statut redox, tels que NF- κ B, AP-1 ou HIF-1 α (facteur inducible par l'hypoxie) qui contrôlent leurs expressions (Yang et Rosenberg, 2011).

Les **MMP** exprimées dans les cellules endothéliales des microvaisseaux constituent une famille d'enzymes protéolytiques, dont les MMP-2 et MMP-9 jouent un rôle clé car elles digèrent les principaux composants de la lame basale : le collagène et la laminine (Kriz, 2006; Mastorakos and McGavern, 2019; Rosell et al., 2008). Hormis la perturbation de la lame basale, les MMP dégradent les protéines de jonction serrées et adhérentes responsables des interactions cellules-cellules étroites dans le système microvasculaire conduisant à une perturbation de la BHE (Yang et Rosenberg, 2011; J. Liu et al., 2012; Reuter et al., 2015). L'implication des MMP dans la perturbation de la BHE a été rapporté dans des modèles d'ischémie expérimentaux (Zhang et al., 2018) et une élévation de MMP-9 a été observée chez des patients atteints d'AVC (Brouns et al., 2011). De plus, une inhibition de l'expression des MMP prévient la perturbation de la BHE suite à une ischémie (Turner et Sharp, 2016).

L'atteinte **des jonctions serrées** (Occludine, Claudine 3 et 5, ZO-1 [Zona Occludens]) est un marqueur de la perturbation de la BHE (Abdullahi et al., 2018). L'hypoxie, l'ischémie – reperfusion cérébrale diminue l'expression de ZO-1 (Zehendner et al., 2013; Zhang et al., 2018) et de VE-cadhérine (Weinl et al., 2015). Une altération de l'expression de l'Occludine est associée à une perturbation de la BHE dans différentes pathologies dont l'hypoxie ; l'hypoxie – réoxygénation et l'ischémie cérébrale (Liu et al., 2018; Liang Jia et al., 2015). Enfin dans des modèles d'ischémie cérébrale, l'expression altérée de la claudine 5 est associée à une augmentation significative de la perméabilité de la BHE (Liu et al., 2012) L'ensemble de ces phénomènes conduit à une augmentation de la perméabilité de la BHE qui se traduit par un œdème cérébral et des transformations hémorragiques.

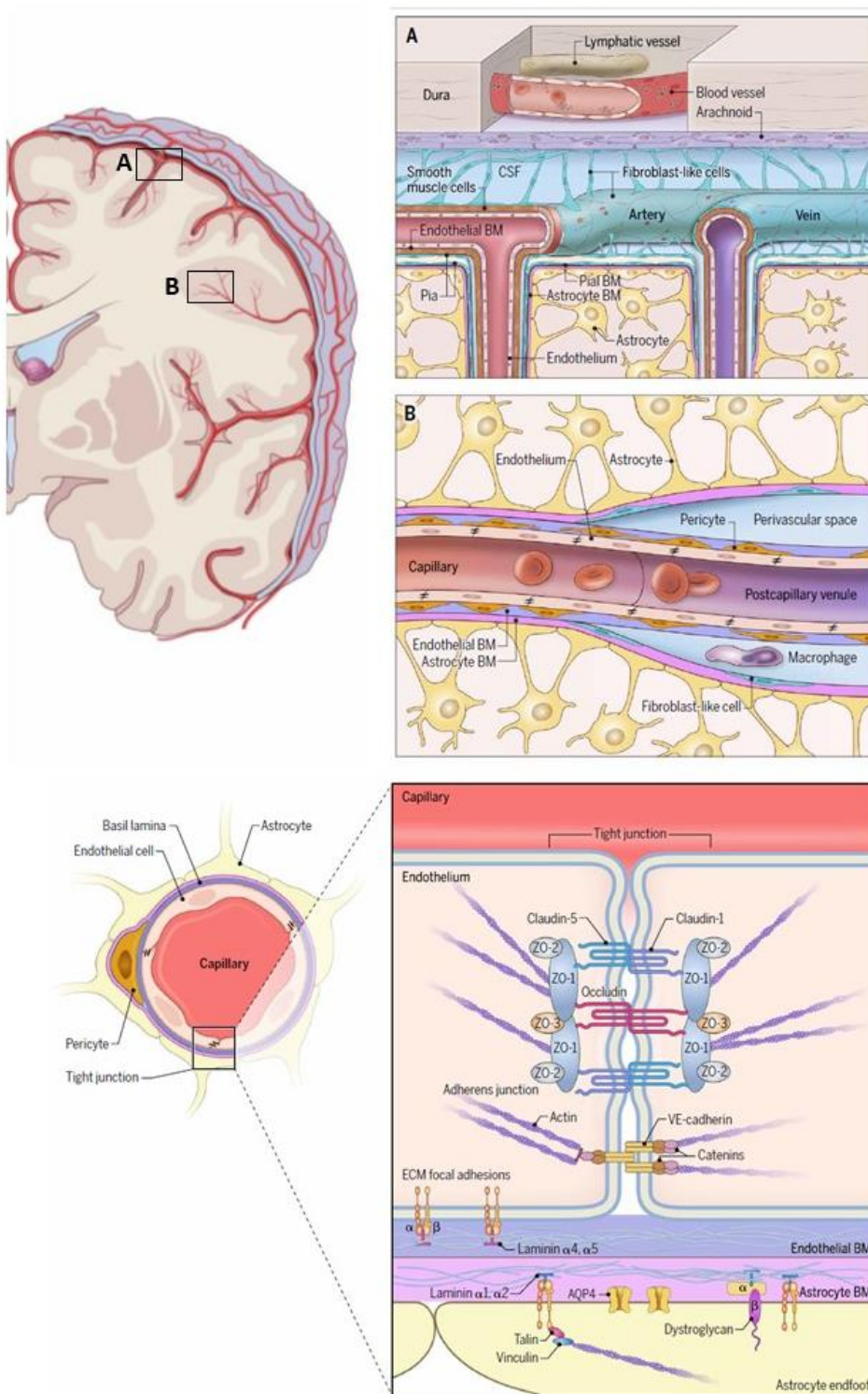


Figure 15 : La barrière hémato-encéphalique.

Abréviations : CSF : Liquide cérospinal ou céphalo-rachidien ; BM : Membrane Basale ; ZO : Zona occludens-1 – jonctions serrées ; VE-Cadhérine : Cadhérine de l'endothélium vasculaire ; ECM : Matrice extracellulaire ; AQP4 : Aquaporine 4. D'après Mastorakos et McGavern, 2019.

5.3.2.2) Transformations hémorragiques

Les transformations hémorragiques (TH), qui sont fortement liées à l'intégrité de la BHE (Sun, 2018 Hindawi), sont une des complications majeures des AVC ischémiques et sont un facteur de mauvais pronostic pour les patients dont notamment 50% de mortalité (Kaesmacher et al., 2017; Valentino et al., 2017; Yaghi et al., 2017). Elles peuvent être spontanées, précoces ou tardives (D'Amelio et al., 2014), et la thrombolyse par le rt-PA augmente leur risque de survenue (Hacke et al., 2008). L'administration tardive du rt-PA semble augmenter le risque de TH et de mortalité (Hacke et al., 2004; Lindley et al., 2004; Wardlaw et al., 2014).

6) Traitements antioxydants dans l'ischémie cérébrale

De nombreux traitements antioxydants se sont révélés efficaces dans des modèles expérimentaux d'ischémie, même lorsque leur administration était retardée, ce qui souligne l'importance des espèces réactives dans les dommages cellulaires associés aux AVC.

6.1) Stratégies antioxydantes dans les études précliniques

Les stratégies antioxydantes utilisées dans les études précliniques peuvent être divisées en 3 groupes qui sont détaillés ci-dessous : l'inhibition de la production d'espèces réactives, la capture des espèces réactives et l'augmentation de leur dégradation (Margaill et al., 2005; Shirley et al., 2014; Liu et al., 2018).

6.1.1) Inhibition de la production d'espèces réactives

Les **NOX** sont l'une des principales sources de production d'ERO au cours de l'ischémie (Ma et al., 2017). L'inhibition des NOX par l'apocynine a démontré une protection au cours de l'ischémie cérébrale sur des modèles de rat (Chen et al., 2009). L'inhibition de la NOX par le diphenyliodonium est protecteur dans un modèle d'ischémie chez le rat mais n'est pas spécifique de la NOX (Nagel et al., 2007). De plus, le VAS2870, un inhibiteur plus spécifique des NOX réduit le volume de lésion et améliore les fonctions neurologiques dans un modèle murin d'ischémie (Kleinschnitz et al., 2010) et le VAS2870 IV augmente l'expression de micro ARN ciblant NOX 2 et 4 (Liu et al., 2017). Enfin, le gp91ds-tat, un inhibiteur de la NOX-2 est neuroprotecteur dans un modèle d'ischémie cérébrale (Zhang et al., 2009).

Les souris KO NOX2 soumises à une ischémie cérébrale présentent un volume de lésion réduit, un état neurologique amélioré et une diminution des dommages dus au stress oxydant par rapport aux souris sauvages (Chen et al., 2009; De Silva et al., 2011). Les souris KO NOX4 présentent un stress oxydant et une neurodégénérescence post-ischémiques réduits (Kleinschnitz et al., 2010), la diminution pharmacologique de l'expression de NOX4 (obtenue par inhibition de la signalisation TLR4-NOX4) diminue le volume d'infarctus (Suzuki et al., 2012). Les études concernant la NOX1 sont contradictoires, certaines ayant démontré un rôle délétère avec une réduction du volume de lésion chez des souris KO NOX1 (Jackman et al., 2009) alors que d'autres études n'ont montré aucun effet (Kleinschnitz et al., 2010). Enfin, une étude a mis en évidence chez des souris KO NOX1 une réduction du volume de lésion et une amélioration neurologique après 1 heure d'ischémie mais aucun effet lorsque la durée d'occlusion était de 2 heures (Kahles et al., 2010).

La **XO** constitue également une source importante d'ERO dans le cadre d'une lésion cérébrale. L'utilisation d'inhibiteurs de la XO tels que l'allopurinol ou son métabolite l'oxypurinol réduit les niveaux d'acide urique, d' $O_2^{\bullet-}$, diminuant la taille de l'infarctus cérébral (Akdemir et al., 2001). D'autres inhibiteurs sont actuellement en développement tels que TEI-6720 (Okamoto et al., 2003), le febuxostat (Becker et al., 2004), l'Y-700 (Yamada et al., 2004) et le BOF-4272 (Naito et al. 2000).

Les inhibiteurs de la **COX-2** dont le NS-398 et le nimésulide réduisent l'infarctus (Iadecola et al., 2001b; Sugimoto and Iadecola, 2003). Le NS-398 et le nimésulide sont toujours efficaces même lorsque leur administration est effectuée jusqu'à 24 heures après l'ischémie. De plus, les souris KO COX-2 ont un volume de lésion diminué après une ischémie cérébrale, comparé à celui des souris sauvages (Iadecola et al., 2001) alors que des souris surexprimant la COX-2 ont des volumes de lésions plus importants (Doré et al., 2003).

Dans un modèle d'ischémie, un inhibiteur de la **12/15 LOX** (baicalein) réduit le volume de lésion (environ 40%) et un modèle de souris KO pour la 12/15 LOX permet également de réduire le volume de lésion (environ 40% ; van Leyen et al., 2006).

Le ciblage de la mitochondrie, qui est une source de production importante d'ERO, semble être également une piste prometteuse. Il a en effet été montré que l'inhibition du complexe mitochondrial inhibait les dommages oxydatifs induits par l'ischémie-reperfusion (Niatsetskaia et al., 2012). Le Coenzyme Q10, un composant de la chaîne de transport des électrons des mitochondries, s'accumule dans la mitochondrie après administration (Matthews et al., 1998) et s'est révélé protecteur dans des modèles d'ischémie cérébrale (Li et al., 2007). La Mitoquinone (MitoQ₁₀), un dérivé de l'ubiquinone ayant une forte affinité (Graham et al. 2009) pour la mitochondrie, et un

antioxydant efficace contre les dommages oxydatifs de H_2O_2 , ont permis d'améliorer la fonction endothéliale dans un modèle d'ischémie chez le rat hypertendu (Graham et al., 2009).

6.1.2) Capture des espèces réactives

Cette stratégie antioxydante est la plus utilisée dans les essais précliniques et cliniques bien que les résultats soient pour l'instant assez décevants. Elle consiste en l'utilisation de composés antioxydants qui sont capables de capter directement les ERON afin de réduire les dommages du stress oxydant et limiter la taille de l'infarctus.

- **La N-acétylcystéine (NAC)** : Elle réduit le volume de lésion de 21 à 45% à 24h (Khan et al., 2004) et de 29 à 49% à 48h (Carroll et al., 1998). La NAC peut capter les radicaux peroxydes, $HO\bullet$ et augmente également la synthèse du glutathion endogène. Les effets de la NAC se sont révélés plus importants lorsqu'elle est administrée avant la reperfusion (-49%) comparé à une administration après (-29%), ce qui souligne l'effet délétère et pro-oxydant de la reperfusion. Cependant, la protection contre les espèces réactives est encore efficace quand l'administration est effectuée jusqu'à 6 heures après la reperfusion 24h (Khan et al., 2004).
- **L'acide lipoïque** : Il réduit le volume de lésion de 38% à 24h (Choi et al., 2015) et la mortalité (Panigrahi et al., 1996). Il capte les radicaux $HO\bullet$, 1O_2 , NO, chélate les métaux de transition et recycle d'autres antioxydants tel que les vitamines E et C, et augmente les taux de glutathion (Packer et al., 1995).
- **Le glutathion** : Il réduit le volume de lésion de 65% à 48h (Anderson et al., 2004). C'est un composant central de la défense antioxydante des cellules, il peut agir directement, ou, indirectement comme substrat de divers GPx afin de détoxifier les espèces réactives (Dringen, 2000)
- **L'acide urique** : Il est un des principaux antioxydants plasmatiques, capte notamment l'ONOO- et permet de réduire le volume de lésions de 35 à 80% à 24h (Margaill et al., 2005)
- **La mélatonine** (N-acetyl-5-methoxytryptamine) : C'est le produit de sécrétion principal de la glande pinéale, elle permet également l'élimination d'ERO tels que $HO\bullet$, 1O_2 , $O_2\bullet^-$, et les radicaux peroxydes. Il a également été rapporté que la mélatonine stimule indirectement l'expression d'ARNm de la SOD, de la GPX, la glutathion réductase (GR), la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et la catalase. La mélatonine permet également de réduire le volume de lésion de 30 à 35% à 24h (Kilic et al., 2004) et de 45 à 54% à 72h (Pei et al., 2002).

- **La Citicoline** : C'est un composé intermédiaire dans la génération de phosphatidylcholine à partir de la choline, qui réduit les acides gras oxydés générés par la peroxydation lipidique durant l'AVC. Une méta-analyse sur 14 études a démontré une réduction de 28% du volume de lésion sur des modèles d'AVC (Bustamante et al., 2012).
- **Les nitrones (N-oxyde)** : Elles ont également la capacité de capter les radicaux libres et réduire le volume des lésions post ischémiques. Le composé α phenyl- tert-butyl nitrone (**PBN**) réduit de 65% le volume de lésion à 24h, de 37 à 58% à 48h (Margaill et al., 2005).
- Le **NXY-059** (2,4-disulfophenyl-Ntert-butylnitron), une nitronne structurellement proche de la PBN, synthétisé plus récemment, est nettement plus efficace que la PBN à dose équivalente (Kuroda et al., 1999). De nombreuses études précliniques ont démontré l'action neuroprotectrice du NXY-059 sur la réduction de l'infarctus et la récupération neurologique dans divers modèles d'AVC chez les rongeurs (Kuroda et al., 1999; Sydserff et al., 2002) et sur des primates non humains (Margaill et al. 2005). Il réduit les volumes de lésions de 33 à 50% à 24h et de 25 à 80% à 48h (Kuroda et al., 1999; Sydserff et al., 2002). Enfin une nouvelle classe de nitrones (les azulényl nitrones) semble prometteuse, avec un composé comme le stilbazulényl nitronne (STAZN) qui exerce un effet neuroprotecteur similaire au NXY-059 à des doses 300 à 600 fois inférieures (Becker et al., 2002; Ginsberg, 2007; Lapchak et al., 2011).
- **Les lazaroides** (21-aminostéroïdes) : Ils ont la capacité de capter l' $O_2^{\bullet-}$, les radicaux peroxydes et de chélater le fer. Le principal composé de cette famille, le U-74006F (ou tirilazad), a permis de diminuer les lésions de 25 à 40% à 24h (Margaill et al., 2005). **Le Tirilazad** est un inhibiteur de la peroxydation lipidique qui a été étudié de manière approfondie dans des modèles précliniques au milieu des années 1990 et qui a démontré une réduction du volume de lésion après une ischémie transitoire (Margaill et al., 2005). Une méta-analyse de 2007 sur 19 publications a montré une diminution de la taille de la lésion de 29% et une amélioration du score neurologique de 48% (Sena et al., 2007). Son efficacité maximale a été observée lors d'administrations antérieures à l'ischémie, avec une efficacité décroissante en fonction du temps d'administration suite à l'AVC.
- **Cerebrolysine** : Cette molécule est isolée à partir d'une préparation de neuropeptide et d'acides aminés de faible poids moléculaire issus de tissus cérébraux de porc (Goenka et al., 2019). La cerebrolysine est neuroprotectrice en inhibant l'excitotoxicité et la formation de radicaux libres et en limitant l'activation microgliale et l'apoptose. *In vitro* cette molécule démontre des capacités neurotrophiques en améliorant la survie cellulaire et la neurogénèse. Des études *in vivo* ont mis en évidence une amélioration des fonctions cognitives et une diminution du volume de lésion dans un modèle d'ischémie (Ren et al.,

2007; Zhang et al., 2010). Et des études *in vitro* ont démontré une neuroprotection sur des modèles de privation en oxygène et glucose (Schauer et al., 2006).

Les vitamines antioxydantes étant l'un des principaux mécanismes de défense naturelle de l'organisme contre les agents oxydants, leur administration peut également être neuroprotectrice.

- **La vitamine E** : C'est une vitamine liposoluble reconnue comme l'un des antioxydants les plus puissant, elle interrompt la propagation des réactions radicalaires dans les lipides des membranes et peut réduire le volume de l'infarctus de 45 à 55% à 24h (Mishima et al., 2003) et 55% à 48h (van der Worp et al., 1998).
- **La Vitamine C (acide ascorbique)** : Elle joue un rôle biologique en tant que donneur d'hydrogène. Elle s'est révélée neuroprotectrice dans des modèles d'ischémie sur des rongeurs et des primates (Miura et al., 2009; Shirley et al., 2014). Une autre étude a rapporté une absence d'effet neuroprotecteur de la vitamine C, alors que sa forme oxydée, l'acide déshydroascorbique (DHA) qui traverse la BHE, permettait une réduction du volume de lésion de 50 à 90% à 24h sur modèle murin (Huang et al., 2001) mais aucun effet n'a été démontré sur un modèle de babouin (Ducruet et al., 2011). Cependant, une autre étude n'a pas montré d'effet bénéfique de la DHA (Ducruet et al., 2011). Enfin, 4 semaines de prétraitement par la vitamine C et E ont permis de réduire le niveau de peroxydation lipidique et le volume de lésion après une ischémie (Zhang et al., 2011).
- **L'EPC-K1** : un diester phosphate de vitamine C et E est capable de capter $\text{HO}\bullet$ et $\text{O}_2\bullet^-$. Il a permis de diminuer le volume de lésion de 40% à 4h, de 30 à 38% à 24h et de 25 à 40% à 72h dans un modèle d'ischémie (Takamatsu et al., 1998).

Les hydroxystilbènes sont des composés polyphénoliques naturels bien connus pour leurs propriétés de piégeage des espèces réactives :

- **Le Resveratrol** (3,5,4V-trihydroxystilbene) : C'est un des composants du vin rouge, il prévient la peroxydation lipidique et diminue le volume de lésion de 48% à 24h (Sinha et al., 2002).
- **L'Oxyresveratrol** (trans-2,3V,4,5V-tetrahydroxystilbene) : C'est un analogue naturel du resveratrol qui capte le H_2O_2 et le NO et permet de diminuer le volume de lésion de 36 à 44% à 24h (Andrabi et al., 2004).
- **L'édaravone** (3-méthyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-5-one ou MCI-186) : Ce composé permet de capter les radicaux $\text{HO}\bullet$, $\text{O}_2\bullet^-$ et peroxyde, et réduit le volume de lésion de 40 à 77% à 24h (Shirley et al. 2014), et l'activation de MMP-9, et réduit les dommages de la BHE (Shirley et

al., 2014). De plus, l'édaravone permet d'étendre la fenêtre thérapeutique du rt-PA et de diminuer ses effets délétères (Shirley et al., 2014).

Une nouvelle approche antioxydante consiste en l'inhalation de gaz pendant ou après l'ischémie, l'hydrogène a permis de réduire la production d' $\text{HO}\bullet$ et a démontré une réduction marquée du volume de lésion et une amélioration des scores neurologiques à 7 jours (Ohsawa et al., 2007). Dans un modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne pendant 90 minutes suivie d'une reperfusion de 30min, l'administration à partir de la reperfusion suffirait à conserver l'effet bénéfique.

6.1.3) Augmentation de la dégradation des espèces réactives

La dernière stratégie pharmacologique antioxydante consiste à augmenter la dégradation des espèces réactives, notamment par l'augmentation des niveaux de SOD ou de CAT. Pour rappel, la SOD catalyse la conversion de $\text{O}_2\bullet^-$ en H_2O_2 et O_2 moins réactif, la CAT et la glutathion peroxydase (GPx) participent à l'élimination d' H_2O_2 , augmentant ainsi l'efficacité globale de la SOD (Warner et al., 2004). Depuis plusieurs années les effets neuroprotecteurs de la SOD et de la CAT sont rapportés sous différentes formes : libres (43 à 57% de réduction du volume de lésion à 48h (Francis et al., 1997), conjuguées à du polyéthylène glycol (21 à 24% ; He et al., 1993), encapsulées dans des liposomes (25 à 33% à 24h ; Imaizumi et al. 1990) ou plus récemment sous forme de nanoparticules (Gil et al., 2017).

- **La SOD** : Parmi les 3 isoformes de l'enzyme, la SOD1 a été la plus étudiée dans des modèles d'ischémie. Les souris transgéniques surexprimant la SOD1 (Fujimura et al., 2000) ont montré une réduction de l'apoptose suite à une ischémie transitoire. L'expression locale de SOD1 par thérapie génique induit également une amélioration de la survie neuronale (Davis et al., 2007). Les souris surexprimant SOD2 ont présenté des effets neuroprotecteurs après une ischémie transitoire (Maier et al., 2006). Enfin, une réduction du volume d'infarctus a également été retrouvée chez des souris surexprimant la SOD3 (Sheng et al., 1999). A l'inverse, des souris KO SOD1 ont présenté une mortalité plus importante, une augmentation du volume de lésion et de l'œdème (Kondo et al., 1997). Les souris KO SOD2 meurent dans les 10 jours qui suivent la naissance et présentent une augmentation des taux de superoxyde et du volume de lésion après l'ischémie (Mehta et al., 2011).

- Des études ont administré de la SOD-Pegylées ou de la SOD recombinante humaine et ont mis en évidence une diminution des dommages ischémiques (Margaill et al., 2005; Shirley et al., 2014; Liu et al., 2018).
- **La CAT** : La surexpression de la catalase s'est révélée protectrice uniquement quand elle est délivrée en amont d'une ischémie chez le rat (Gu et al., 2004).
- **La GPx** : Des souris surexprimant la GPx présentent une réduction significative du volume d'infarctus par rapport aux souris sauvages après une ischémie-reperfusion et à l'inverse, les souris KO GPx montrent une augmentation du volume de lésion (Liu et al., 2018b; Margaill et al., 2005; Shirley et al., 2014).

D'autres études ont utilisé des molécules synthétiques aux propriétés catalytiques semblables à celles de ces enzymes.

- **Le TEMPOL** : Il présente une activité SOD-like, peut moduler les niveaux de NO, détoxifier les radicaux lipidiques et réagir avec les radicaux peroxydes et alkoxydes. Il réduit le volume de lésion de 50% à 4h (Kato et al., 2003).
- **EUK-134** : Ce composé a la capacité de métaboliser l' H_2O_2 et l' $O_2^{\bullet-}$ par ses capacités SOD et CAT like. Il réduit le volume de lésion de 90% à 21h et de 86% à 3 jours (Baker et al., 1998).
- **M40401, AEOL 10113 et AOEL 10150** : Ces trois composés ont des activités SOD-like et permettent de réduire le volume de lésion respectivement de : 73% à 24h, 47% à 48h et 35 à 77% à 7 jours ; 25% à 24h et 25 à 43% à 7 jours (Margaill et al., 2005).
- **L'Ebselen** (2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H) -one) : Ce composé imite l'effet de GPx, l'une des principales enzymes permettant la dégradation de l' H_2O_2 , de l'ONOO- et des peroxydes organiques, et peut également inhiber la peroxydation lipidique, la lipoxygénase, la NOX et la NOS. Ce produit permet de réduire le volume de lésion de 28 à 37% à 24h et de 27% à 4 jours (Margaill et al., 2005). Cependant il a été montré qu'une dose unique n'avait aucun effet, d'où la nécessité de faire des administrations répétées. De plus, l'amélioration des dommages ischémiques et des déficits sont valables lorsque l'ebselen est administré au préalable, ou au moment de la reperfusion. Le traitement post-ischémique entraîne une protection modeste (Margaill et al., 2005).
- **Le Lubeluzole** : Il agit en réduisant les niveaux de NO et la production d'ONOO- dans les cellules hypoxiques par inhibition de la voie des NOS induite par le glutamate. Dans un modèle d'ischémie, le lubeluzole a réduit le volume de lésion de 50% lorsqu'il est administré 15 min après l'ischémie et de 33% quand il est administré 3h après de début de l'ischémie (Margaill et al., 2005).

Une nouvelle classe d'antioxydants, les métalloporphyrines, peut catalyser la décomposition de l'ONOO⁻ en ions nitrates, diminuant ainsi leur décomposition en dioxyde d'azote ou radicaux HO•, et également présenter une activité SOD-like. Par exemple le **FeTMPyP** (5,10,15,20-tetrakis(N-méthyl-4V-pyridyl)porphyrinato iron (III)) diminue le volume de lésion de 38 à 72% à 72h, tandis que le **FeTPPS** (5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato iron (III)) le réduit de 28 à 62% à 24h 72h (Thiyagarajan et al., 2004).

6.1.4) Inhibition des récepteurs glutamatergiques

Une autre stratégie consiste à agir en amont du stress oxydant, en limitant l'excitotoxicité par blocage des récepteurs glutamatergiques (Sun et al., 2019; Goenka et al., 2019). Durant la phase aiguë (jusqu'à 24h après l'ischémie), des antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA tel que le MK-801 ou le NBQX ont démontré des effets protecteurs sur des modèles d'ischémies « *in vitro* » et « *in vitro* » (Virgili et al., 1995) et la synergie de MK-801 et AP-3 (antagoniste des mGluR) a diminué la mortalité cellulaire induit par une privation en oxygène et glucose (OGD). Lors d'administration plus tardive (24h après l'ischémie), le MK-801 n'a pas démontré d'effet bénéfique alors que la memantine promeut la plasticité contralatérale et le remodelage peri-infarctus (Sun et al., 2019; Goenka et al., 2019). La faible efficacité et les importants effets secondaires limite la translation des antagonistes des récepteurs glutamatergiques en clinique (Sun et al., 2019). Le sulfate de magnésium a été évalué pour lutter contre l'excitotoxicité (Goenka et al., 2019). Des résultats encourageants ont été obtenus en préclinique et un essai clinique pilote a démontré une neuroprotection après une ischémie bien que d'autres n'ont pas montré d'effet supérieur au placebo (Sun et al., 2019; Goenka et al., 2019).

Pour résumer, bien que ces stratégies antioxydantes aient été administrées avant ou peu de temps après l'ischémie cérébrale, ces données mettent en évidence l'implication des espèces réactives dans les lésions cérébrales. Seules quelques études ont démontré que certains agents restaient neuroprotecteurs même administrés jusqu'à 24 heures après l'occlusion. De plus, il est à noter que pour atteindre une efficacité élevée, les agents doivent être capables de traverser la BHE.

6.2) Stratégies antioxydantes dans les essais cliniques

Malgré la multitude d'études expérimentales démontrant un effet bénéfique des stratégies antioxydantes, seuls quelques antioxydants ont été testés dans des essais cliniques.

- **L'allopurinol :**

Certains essais cliniques ont mis en évidence des effets bénéfiques dont une amélioration vasculaire et une diminution de l'inflammation (Taheraghdam et al., 2014), mais un autre essai clinique n'a démontré aucune amélioration (Dawson et al., 2009).

- **Cerebrolysine**

Cette molécule est actuellement approuvée pour le traitement de l'ischémie cérébrale dans 45 pays, notamment dans les pays asiatiques (Russie, Chine) bien que les résultats des essais cliniques soient médiocres (Goenka et al., 2019). Plusieurs essais cliniques de Phase III et IV ont échoué à démontrer un effet bénéfique par rapport au placebo et aucune étude de sécurité de la molécule n'a été conduite (Goenka et al., 2019; Wang et al., 2017).

- **Minocycline**

Cette molécule est un antibiotique dérivé de la tetracycline (Goenka et al., 2019) qui inhibe l'activité de la NOSi, des MMP, de la COX-2 et de la PLA2. Plusieurs essais cliniques ont rapporté une amélioration significative, notamment sur le score de Rankin et de Barthel (Amiri-Nikpour et al., 2015) bien que d'autres études n'aient pas rapporté d'amélioration par rapport au placebo (Goenka et al., 2019).

- **Tirilazad mesylate (U-74006F)**

Après un essai clinique de phase I, et le premier essai de phase II (STIPAS : Study of Tirilazad mesylate in Patients with Acute ischemic Stroke), deux études de phases III ont été initiées : RANTTAS, mené sur 660 patients (Randomized Trial of Tirilazad in Acute Stroke) et TESS (Tirilazad Efficacy Stroke Study). Ces deux essais ont dû être arrêtés prématurément. Les résultats de RANTTAS publiés en 1996 suggéraient que le tirilazad n'améliorait pas le résultat fonctionnel global ni aucun des paramètres étudiés (Glasgow Outcome Scale and Barthel Index) à 3 mois (RANTTAS, 1996). Il a été démontré que les femmes métabolisaient le tirilazad jusqu'à 60% plus efficacement que les hommes, et par conséquent la dose administrée n'avait peut-être pas été suffisante pour assurer la neuroprotection, réduisant ainsi l'efficacité de l'essai clinique. Un autre essai clinique a été lancé (RANTTAS II) avec une dose plus élevée mais aucun effet n'a été trouvé (Haley Clarke, 1998). Enfin,

une méta-analyse sur 6 essais cliniques dont 2 non publiés a conclu que le tirilazad augmentait la mortalité et les handicaps après un AVC ischémique (« Tirilazad Mesylate in Acute Ischemic Stroke. Tirilazad International Steering Committee », 2000).

- **Ebselen** (Harmokisane)

Un essai clinique mené au Japon sur 300 patients victimes d'AVC ischémique a rapporté que l'Ebselen améliorait le score de Glasgow à 1 mois, avec une absence d'effet à 3 mois (Yamaguchi et al., 1998). Deux autres scores avaient également été améliorés par le traitement, l'effet était plus important chez les patients ayant des lésions du cortex cérébral par rapport aux lésions profondes (Yamaguchi et al., 1998).

- **Edaravone** (MCI-186)

Une étude de phase III lancée au Japon (Edaravone Acute Infarction Study Group, 2003) dont les résultats ont été publiés en 2003 a montré une amélioration significative évaluée par l'échelle de Rankin et des améliorations cliniques significatives dans les 3 mois. Cependant, sur des patients victimes d'AVC cardioembolique, l'edaravone a présenté des améliorations minimales (Inatomi et al., 2006). De plus une autre étude a démontré une réduction significative de la taille de l'infarctus sur l'occlusion de petits vaisseaux, mais les améliorations neurologiques observées dans l'année n'étaient pas maintenues après un an (Nakase et al., 2011). L'edaravone a été introduite sur le marché japonais pour une utilisation clinique dans le traitement de l'AVC ischémique aigu en juin 2001 et, bien que son efficacité est critiquée, elle est largement utilisée dans les cliniques japonaises (Lapchak, 2010). Dans une étude clinique sur des patients présentant une occlusion de l'artère carotide interne, l'edaravone a retardé l'évolution de l'infarctus et de l'œdème et a diminué la mortalité au stade aigu, cependant elle n'a pas amélioré le résultat fonctionnel des patients (Toyoda et al., 2004). De plus, de nombreuses études ont démontré un effet bénéfique de l'edaravone chez les patients ayant subi un AVC (meilleurs résultats fonctionnels et indépendance supérieure à 3 mois ; Shinohara et al., 2009).

D'autres essais cliniques sont actuellement menés avec l'edaravone : trois essais de phase II débutés en 2009 (NCT00821821), 2013 (NCT01929096), et 2017 (NCT03346538), un essai de phase III débuté en 2015 (NCT02430350) et deux essais de phase IV débutés en 2004 (NCT00200356 et NCT00153946).

- **NXY-059** (Cerovive)

La sécurité et la tolérance du NXY-059 ont été testées dans deux essais cliniques, suivis d'un essai de phase IIb/III (SAINT for Stroke-Acute Ischemic-NXY-059 Treatment). L'essai initial SAINT I qui impliquait 1722 patients (Lees et al., 2006) a montré une amélioration significative des patients

traités par le NXY-059 sur le score de Rankin modifié, mais une absence d'effet sur l'échelle du NIHSS ou sur l'index de Barthel. L'année suivante, SAINT II comptait 3 306 sujets et n'a montré aucun effet sur les différents critères de jugement (Diener et al., 2008; Shuaib et al., 2007). La différence de résultat entre ces deux essais a été attribuée à la faiblesse statistique de SAINT I et à la faible perméabilité de NXY-059 pour la BHE (Saver, 2007; Diener et al., 2008).

- **Lubezole :**

Une première étude clinique sur 193 patients a été arrêtée prématurément en raison d'un déséquilibre de mortalité dans les groupes recevant la dose la plus élevée (20 mg/jour), effet non observé dans le groupe recevant la plus faible dose (10 mg/jour ; Shirley et al., 2014). L'année suivante, une étude sur 721 patients n'a montré aucune amélioration de la mortalité à 12 semaines, mais une amélioration sur l'échelle du NIHSS et de l'index Barthel a été rapportée, résultat confirmé l'année suivante par une étude similaire (Shirley et al., 2014). Une plus large étude sur 1786 patients n'a par la suite montré aucune différence entre les groupes (Shirley et al., 2014). Une méta analyse sur 5 essais cliniques n'a révélé aucune amélioration de la mortalité ou de la dépendance, et a de plus relevé divers effets secondaires (Gandolfo et al., 2002).

- **Vitamine A, E et C :**

De vastes études d'observation chez l'homme ont montré qu'une augmentation des taux plasmatiques de vitamine C était corrélée à une incidence réduite d'AVC (Margaill et al., 2005; Shirley et al., 2014). Cependant, sur des essais randomisés contrôlés, les patients recevant une supplémentation en vitamines ne présentaient aucune différence dans l'incidence des AVC (Margaill et al., 2005; Shirley et al., 2014). Des résultats similaires ont été trouvés pour la supplémentation en vitamine E avec une méta-analyse d'essais randomisés contrôlés ne montrant aucun bénéfice sur l'incidence des AVC (Margaill et al., 2005; Shirley et al., 2014).

- **Citicholine :**

Un essai clinique et une analyse de 4 essais cliniques ont démontré un effet bénéfique après un AVC (Dávalos et al., 2002) ; en désaccord avec d'autres essais cliniques qui n'ont montré aucune amélioration (Dávalos et al., 2012).

Les raisons de l'échec ?

Malgré les progrès réalisés dans la compréhension de la physiopathologie de l'AVC et les efforts considérables déployés en recherche thérapeutique, les nombreuses molécules efficaces au stade préclinique ont échoué dans les essais cliniques (Dirnagl, 2006). Un certain nombre de facteurs ont pu jouer un rôle dans ces divergences de résultats entre les études précliniques et les essais cliniques. Afin de traiter ces questions, une conférence d'universitaires et de représentants de l'industrie a été organisée afin de suggérer un ensemble de lignes directrices pour l'évaluation des thérapies précliniques, connue sous le nom de « STAIR » (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) initiée en 1999 (STAIR, 1999 Stroke) et révisée en 2009 (Fisher et al., 2009). Une revue sur 3 500 articles publiés de 1957 à 2003 démontre que 5 des 550 traitements déclarés comme efficaces répondaient pleinement aux normes fixées par les directives « STAIR » (O'Collins et al., 2006). L'une des principales conclusions de cette étude est un manque de randomisation et de réalisation en « aveugle » des études précliniques, ce qui a entraîné une surestimation de l'efficacité des traitements. Bien qu'il y ait une tendance générale à l'amélioration de la conception des études sur les AVC, seules 36% des études rapportent une randomisation, 29% une évaluation en aveugle des résultats, 11% une réalisation en aveugle des expérimentations et 3% rapporte l'utilisation de calcul dans la génération de la taille de l'échantillon (Sena et al., 2007b). Afin d'augmenter les chances de réussite de la traduction préclinique à clinique, il est essentiel d'améliorer la conception des études et de tester les molécules dans différents modèles (O'Collins et al., 2009).

TROISIÈME PARTIE : Les Nanoparticules

1) Généralités

1.1) Définitions

Le terme « nano » provient du mot grec « nanos » qui signifie « nain », actuellement il est défini comme « élément qui signifie petit » ou « élément divisant une unité par un milliard ». En effet, un nanomètre équivaut à 1 milliardième de mètre (10^{-9}m). Les définitions des nanomatériaux et des nanoparticules sont exposées ci-dessous, elles peuvent varier en fonction des instances proposant la définition et comporter plus ou moins de complexité.

Nanomatériau (ou nano-objet) : Matériau ayant [au moins] une dimension externe à l'échelle nanométrique (1-100nm ; ISO/ TS 8004-4 : 2011, Nanotechnologies).

Nanoparticules : Nano-objet dont les 3 dimensions sont à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire une particule dont le diamètre nominal est inférieur à 100nm (ISO TS/ 27687 ; Ricaud et Witschger, 2012).

Nanoparticules : Matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm (Commission Européenne, octobre 2011 ; Wacker, 2014). La figure 16 représente l'échelle du nanomonde.

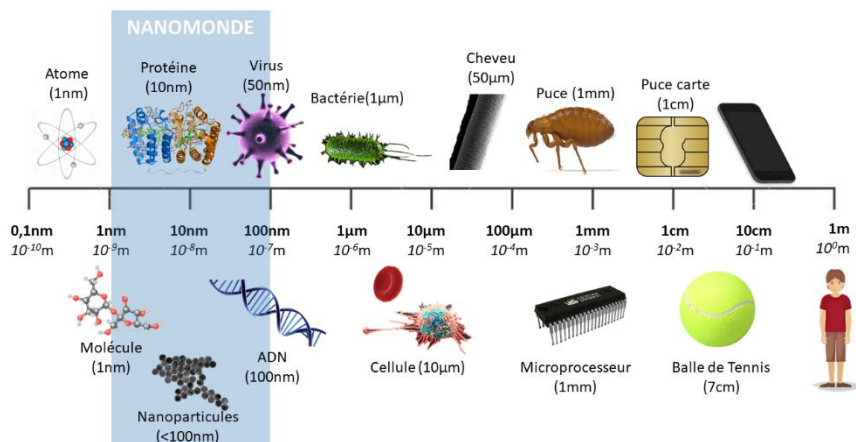


Figure 16 : Notion d'échelle du nanomonde. (D'après La Semaine Vétérinaire n° 1534, 2013).

1.2) Caractérisation des Nanoparticules

Les nanoparticules sont caractérisées par plusieurs paramètres, les principaux étant la forme, la taille, la structure, l'état de surface et l'état de dispersion qui seront détaillés par la suite. La caractérisation des nanomatériaux est importante pour les organiser et les classer mais également pour comprendre le comportement, le devenir et les interactions des matériaux de taille nanométrique.

1.2.1) Dimensions

Les nanomatériaux n'ont pas forcément une taille nanométrique dans les 3 dimensions, ils peuvent avoir une taille nanométrique dans 0, 1, 2 ou dans les 3 dimensions (Peng et al., 2014; Kargozar et Mozafari, 2018)

0 dimension : Aucune de leur dimension externe n'est à l'échelle nanométrique, l'aspect nanométrique peut être dû à leur structure interne ou de surface (Lu et al., 2000).

1 dimension : Également appelés nano-revêtements, ces particules n'ont qu'une seule dimension à l'échelle nanométrique ; elles servent à recouvrir un matériel de quelques couches atomiques afin de la modifier pour la rendre par exemple conductrice ou biocompatible (Diaz et al., 2013).

2 dimensions : Nanomatériaux dont 2 dimensions sont nanométriques et la 3^{ème} généralement de l'ordre du micromètre dont voici plusieurs exemples : Les **nanofibres** utilisés en ingénierie tissulaire, osseuse ou musculaire (Rezvani et al., 2016) ; les **nanotubes** caractérisés par une forme cylindrique creuse (Tománek et al., 2008); les **nanofils** possédant le plus grand ratio longueur/ largeur (Boukai et al., 2008) et les **nanobâtonnets** à la frontière avec la dernière catégorie car leur longueur est de quelques dizaines de μm (Pérez-Juste et al., 2005).

3 dimensions : Les nanomatériaux à 3 dimensions ont toutes leurs dimensions externes à l'échelle nanométrique et sont communément appelés nanoparticules (NP). Cette catégorie sera développée dans la suite du manuscrit.

1.2.2) Formes

Les nanoparticules peuvent avoir de nombreuses formes géométriques indépendamment de l'élément qui les compose (Figure 17) : **sphérique pleine** pour les NP d'oxyde de cérium ou de fer, **sphérique creuse** telle que les Fullerènes, **cubiques** dont les NP de Palladium, en forme de **bâtonnet**, d'**étoile** (Khlebtsov et al. 2013).

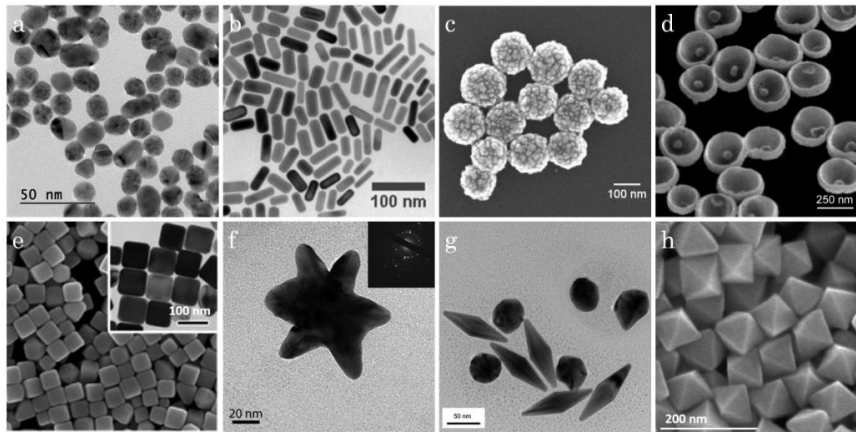


Figure 17 : Images de différentes géométries de NP d'or par microscopie électronique.

(a) colloïdal, (b) bâtonnets, (c) particules de silices entourées d'une nanocoquille d'or, (d) NP d'or dans une coupelle d'or, (e) cubes d'argent, (f) étoile, (g) bipyramide, (h) octaèdre. D'après Khlebtsov et al., 2013.

1.2.3) Taille

La taille est un élément primordial des NP car il permet d'appréhender les effets de surface (ou surface spécifique) correspondant à la surface d'interaction possible en fonction du volume de la particule. Ainsi, à volume constant, plus une particule est petite plus sa surface totale d'interaction sera élevée (Figure 18). Cela se traduit par une activité de surface supérieure qui augmente la vitesse des réactions chimiques et améliore l'efficacité de nombreux processus.

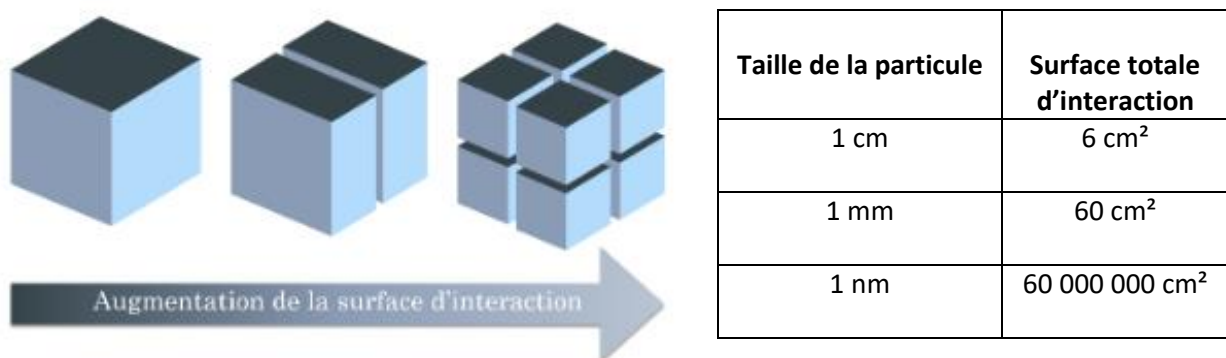


Figure 18 : Surface d'interaction en fonction du volume.

(A) Augmentation de la surface d'interaction lorsqu'un volume donné est fractionné. (B) Surface totale d'interaction d'un matériau de 1cm³ de volume en fonction de la/ les particule(s) qui le compose(nt) - modèle de particules cubiques. D'après Ichinose et al., 2012.

La taille peut être mesurée par plusieurs techniques reposant sur des principes différents. Les techniques principales sont la microscopie électronique à transmission ou à balayage et la microscopie à force atomique, ces techniques permettant également d'obtenir des informations sur la morphologie des NP. L'observation directe peut être combinée à d'autres techniques dont la diffusion dynamique de la lumière (DLS - Dynamic Light Scattering), méthode d'analyse spectroscopique qui permet la mesure du rayon hydrodynamique des NPs en phase aqueuse. De plus, l'indice de polydispersité renseigne sur l'homogénéité de la suspension. Cependant, la DLS ne renseigne pas sur la morphologie des NP et le rayon hydrodynamique mesuré est celui d'une sphère, ce qui peut être problématique pour toute NP non sphérique. Il est par conséquent important d'utiliser ces deux techniques qui sont complémentaires.

Les nanoparticules ne sont généralement pas utilisées telles quelles après leur synthèse, elles sont mises sous forme colloïdale, c'est-à-dire un mélange homogène de deux phases non miscibles. Les NP sont dispersées et mises en suspension dans une phase continue qui peut être solide, liquide ou gazeuse en fonction des applications visées. Dans le cas des nano-médicaments la phase continue est généralement un liquide aqueux, le terme de suspension colloïdale est alors utilisé.

1.2.4) Structure

La structure des NP peut être cristalline ou amorphe. Dans le cas d'un matériau cristallin, l'arrangement des atomes entre eux forme un motif répété au sein d'un réseau régulier. A l'inverse, les atomes des matériaux amorphes ne présentent pas d'arrangement spécifique à moyenne et grande distance.

La structure globale d'une particule est liée à sa structure interne mais également à la structure de sa surface. Il peut être en effet utile de modifier la surface de certaines NP en fonction des applications envisagées. Si cette modification de surface est liée à l'ajout d'une ou plusieurs couches de matériau, le terme cœur/ enveloppe ou NP/ recouvrement (« *coatings* ») est alors utilisé. Ces recouvrements peuvent permettre de fonctionnaliser une NP avec des atomes métalliques, des polymères, des tensioactifs ou de petites molécules. Ces modifications de surface peuvent avoir pour but de protéger le cœur des NP, cibler spécifiquement un tissu / un type cellulaire (Chan et al., 2009), améliorer l'interaction entre particules (Su et al., 2015) ou à l'inverse stabiliser leurs interactions en greffant du citrate (Safi et al., 2010), des longues chaînes de polymères telles que le Polyéthylène Glycol (PEG) ou de l'acide poly acrylique (PAA ; Safi et al., 2010).

1.2.5) Charge

La mesure du potentiel zêta permet d'évaluer la charge acquise par une NP en suspension, cette charge étant due aux ions qui l'entourent quand elle est en milieu aqueux. Ce potentiel zêta influence la stabilité et la dispersion des NP en milieu aqueux mais également l'interaction avec les systèmes biologiques dont la membrane cellulaire (Torrano et al., 2013) ou les protéines plasmatiques (das Neves et al., 2012). Ce potentiel est déterminé par électrophorèse laser Doppler. Le potentiel zêta est très dépendant de la composition des milieux d'étude et est en particulier influencé par le pH ou la force ionique (Wacker et al., 2011).

1.2.6) Dispersions

Les NP en phase aqueuse peuvent se présenter sous 3 états de dispersion (Nichols et al., 2002 ; Figure 19) :

Dispersée : Répartition homogène et unitaire des nanoparticules (Figure 19.A).

Agglomérée : Groupe de NP maintenues entre elles par des interactions faibles (de van der Waals ou électrostatiques), elles demeurent facilement dispersibles (Figure 19.B).

Agrégée : Groupe de NP maintenues ensemble par des interactions fortes (covalentes ou métalliques), si cet agglomérat dépasse 100 nm il est considéré comme une microparticule (Figure 19.C).

L'état de dispersion d'une suspension de NP est primordial, notamment à cause de l'effet de surface. L'environnement joue un rôle important dans la formation d'agrégats (Bruinink et al., 2015) et notamment le pH, la présence de tensio-actifs ou de protéines.

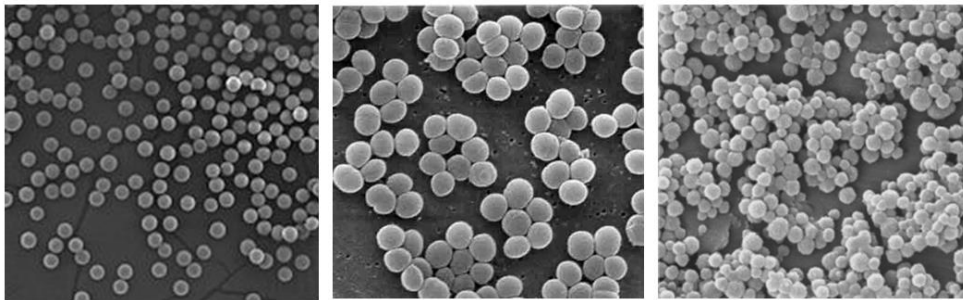


Figure 19 : Présentation des différents états de dispersion de NP colloïdales en microscopie électronique à balayage (MEB). (A) État dispersé, (B) État aggloméré, (C) État agrégé évaluée.

1.2.7) Interaction des NP

L'interaction entre les particules est corrélée à leur probabilité de rencontre et cette probabilité est notamment liée aux mouvements browniens (Figure 20). Ce mouvement est dû à l'interaction de petites molécules d'eau avec la particule générant ainsi des chocs et donc une force qui provoque un mouvement aléatoire des particules (Figure 20.A). Or, plus une particule est petite, plus la taille (relative à la particule) et la force des molécules d'eau sera élevée et plus son déplacement induit par les mouvements browniens sera important (Figure 20.B). Ainsi, une particule petite sera plus mobile et aura une probabilité plus importante de rencontrer une autre particule avec la possibilité

d'interagir avec elle et de former des agglomérats ou agrégats. Cela souligne l'importance de limiter l'interaction entre NP en les recouvrant d'un revêtement.

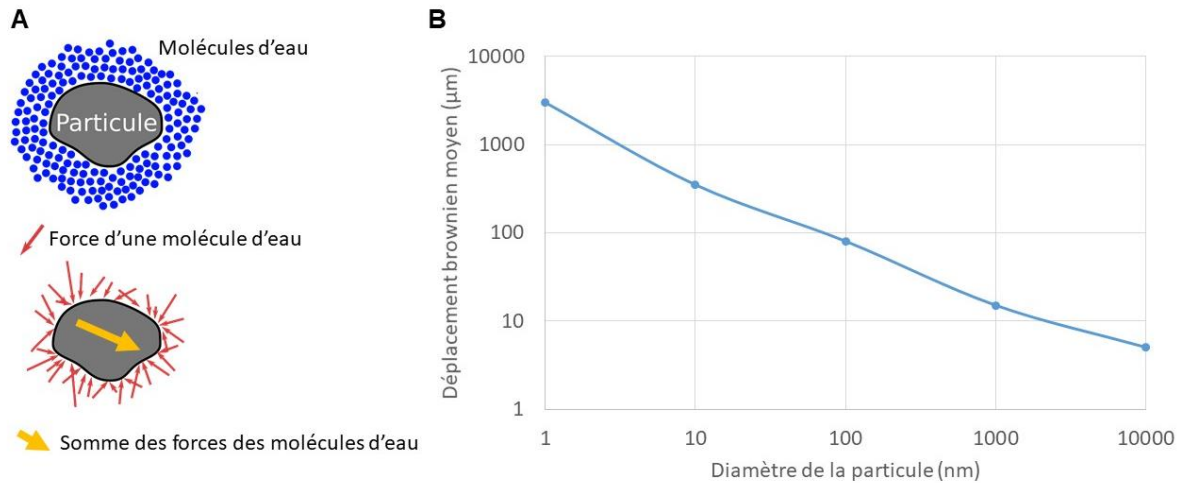


Figure 20 : Mouvement brownien des particules.

Représentation schématique du mouvement brownien (A) et correspondance entre le diamètre de la particule et le déplacement dû aux mouvements browniens (B).

Une suspension de NP, par définition insoluble dans la phase dispersante, est instable, il est donc important d'étudier et contrôler la dispersion afin d'éviter des phénomènes d'agrégaions irréversibles. Le contrôle de l'agglomération des NP permet d'obtenir une réversibilité du mécanisme (floculation).

La théorie **DLVO** modélise la stabilité d'une suspension colloïdale de particules chargées (Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek ; Derjaguin, Churaev, et Muller 1987). Cette théorie considère que le potentiel d'interaction entre deux particules sphériques est fonction des forces d'attractions, de répulsions mais également de la distance séparant deux NP. Certaines forces attractives ou répulsives sont représentées dans le tableau IV (Nel et al., 2009).

Pour des distances de séparation très faibles (< 5nm), les forces attractives (de van der Waals) seront prépondérantes et entraîneront une interaction des NPs. A des distances plus importantes (5 à 15nm), des NP chargées (positivement ou négativement) pourront se repousser si leur potentiel est supérieur à 30mV, par les forces électrostatiques. Enfin, un recouvrement des NP par des polymères neutres entraîne une répulsion stérique par séparation des NP.

Tableau IV : Interactions possibles entre particules avec leurs origines et leurs conséquences.

D'après Nel et al., 2009.

| Interactions | Origines | Conséquences sur les nanoparticules |
|---------------------|--|--|
| Hydrodynamique | Diffusion brownienne, force de cisaillements, force de résistance et de portance | Agglomération et agrégation |
| Electrodynamique | Force de Van der Waals | Agrégation |
| Électrostatique | Interface chargée | Répulsion, oxydation |
| Solvatation | Interaction solvant/ nanoparticules | Couche de solvatation et dissolution |
| Stérique | Phénomènes d'adsorption, interfaces répulsives | Amélioration de la stabilité colloïdale |

1.3) Applications des nanoparticules

A l'heure actuelle les USA et la Chine sont identifiés comme leaders dans le domaine de la recherche et du développement des nanotechnologies (Jackman et al., 2016) bien que plus de 60 pays aient lancé des programmes nationaux en nanotechnologie en 2016 (Kargozar and Mozafari, 2018).

Les nanotechnologies ont un large champ d'application puisqu'elles couvrent aussi bien les énergies du futur, la nanoélectronique, le traitement des eaux, la production agro-alimentaire, les cosmétiques mais également la nano-médecine, domaine qui nous intéresse plus spécifiquement (Kargozar and Mozafari, 2018; Pelaz et al., 2017).

2) Nanoparticules et médicaments

La nano-médecine associe la nanotechnologie aux sciences biomédicales et pharmaceutiques (Bobo et al., 2016; Caster et al., 2017; Ventola, 2012). Les NP peuvent présenter de nombreux avantages en termes de pharmacocinétique, de sécurité et de ciblage (Havel, 2016). De nombreux nano-médicaments sont entrés en clinique et d'autres sont en cours d'essais cliniques pour une large variété d'indications (Caster et al., 2017).

2.1) Historique

Le concept de nanotechnologie a été introduit par le prix Nobel Richard P. Feynman en 1959, mais le terme de nanotechnologie a été inventé par Norio Taniguchi en 1974. En 1965, les vésicules lipidiques ou liposomes ont été les premiers nanosystèmes à être développés, notamment pour solubiliser et délivrer des principes actifs (PA) hydrophiles ou lipophiles (Bangham et al., 1965). Dans les années 1980, des systèmes liposomaux plus complexes ont été développés, permettant la libération d'un PA en fonction du changement de pH ainsi que les premiers ciblage cellules-spécifiques (Leserman et al., 1980) ainsi qu'une augmentation de leur durée de circulation (Allen and Chonn, 1987). La première utilisation de chaînes de polyéthylène glycol (PEG) pour réduire la clairance, augmenter la biocompatibilité, la furtivité et la durée de circulation date de 1990 (Klibanov et al., 1990). Les premiers traitements à base de NP polymériques sont utilisés à partir de 1994 (Gref et al., 1994) dont le Doxil® (doxorubicine encapsulée dans des liposomes PEGylés) approuvé par la FDA en 1995 pour le traitement du sarcome de Kaposi associé au SIDA (Barenholz, 2012).

Ainsi, différentes générations de nanovecteurs ont été progressivement développées (Patrick Couvreur, 2010) :

- Nano-vecteurs de 1^{ère} génération : Ils permettent de diminuer la toxicité de certaines molécules tout en augmentant leur efficacité, essentiellement dans le cas de pathologies hépatiques. Cependant, leur surface n'étant pas modifiée, ils présentent une demi-vie plasmatique courte et s'accumulent rapidement dans le foie car ils sont notamment reconnus par le système réticulo-endothélial.
- Nano-vecteurs de 2^{nde} génération : Recouverts par des polymères (PEG par exemple), leur temps de circulation plasmatique est nettement amélioré ce qui augmente leur chance d'atteindre le ou les organe(s) cible(s).

- Nano-vecteurs de 3^{ème} génération : Ils possèdent des ligands à leur surface (on parle de NP fonctionnalisées) reconnaissant des récepteurs situés sur des cellules ou tissus particuliers, permettant ainsi une délivrance plus spécifique des PA.

2.2) Applications des nano-médicaments

Les nano-médicaments présentent de très nombreuses applications en médecine (Pelaz et al., 2017; Ragelle et al., 2017) dont les nano-diagnostiques, les nano-biomatériaux, les nano-thérapies et les nano-théranostiques (: thérapie et diagnostic ; Pelaz et al., 2017; Ragelle et al., 2017).

En effet, les NP sont déjà utilisées dans différents domaines tels que la vaccination (5%), le diagnostic (7%) mais c'est principalement dans le domaine thérapeutique (88% dont 8% dans la médecine régénérative) que les progrès sont le plus attendus. Les NP devraient être de plus en plus utilisées dans le futur, notamment grâce au ciblage spécifique de certaines cellules ou tissus (Bobo et al., 2016; Kargozar and Mozafari, 2018; Pelaz et al., 2017; Ragelle et al., 2017; Sainz et al., 2015; Ventola, 2012).

Les nano-médicaments peuvent apporter de nombreux avantages physiques et biologiques tels qu'une solubilité ou pharmacocinétique améliorées, une efficacité accrue, une sélectivité pour certains tissus ou cellules et une réduction de la toxicité (Ventola, 2012; Sainz et al., 2015; Bobo et al., 2016; Pelaz et al., 2017; Ragelle et al., 2017; Ventola, 2017; Kargozar et Mozafari, 2018).

2.1.1) Encapsulation

La conjugaison ou l'encapsulation d'un agent thérapeutique dans une NP permet de piéger et protéger le PA mais également de modifier sa pharmacocinétique afin de surmonter certaines limites propres aux médicaments conventionnels (Ventola, 2012; Sainz et al., 2015; Ventola, 2017). Ils peuvent ainsi être conçus pour permettre à un médicament d'atteindre des zones auparavant imperméables, de circuler plus longtemps, de modifier le profil concentration-temps, de cibler directement un site pathologique ou sain (Bobo et al., 2016; Ventola, 2012; Havel, 2016; Wolfram et al., 2015; Ventola, 2017), ou de réduire les doses administrées (Sainz et al., 2015; Wolfram et al., 2015).

2.1.2) Amélioration de l'efficacité et diminution de la toxicité

L'accumulation de nano-médicaments dans les tissus malades peut permettre une réduction de la dose efficace du médicament et par conséquent diminuer ses effets secondaires (Wolfram et al., 2015). Généralement, moins de 0,01% d'un agent thérapeutique s'accumule dans une région cible contre 1 à 5% pour les NP (Wolfram et al., 2015). Les premiers nano-médicaments approuvés par la FDA l'ont été sur la base d'une toxicité inférieure. Par exemple, pour les traitements anti-cancéreux, il existe une toxicité du principe actif mais également de certains excipients. En effet, certains agents anticancéreux sont hydrophobes et insolubles en phase aqueuse, nécessitant par conséquent l'ajout d'agents de solubilisation toxiques tels que l'huile de ricin (Caster et al., 2017; Wolfram et al., 2015). Ainsi, afin de limiter cette « double » toxicité (du principe actif et des excipients), la dose du médicament administré est souvent réduite, ce qui impacte son efficacité. Or, l'utilisation de nano-médicaments pourrait permettre de réduire la dose de principe actif grâce à une accumulation plus spécifique mais également d'utiliser des adjuvants biocompatibles tels que les liposomes. Ainsi l'Abraxane (paclitaxel, Celgene), un traitement contre le cancer du sein métastatique, a été approuvé en 2005 par la FDA, il est mieux toléré et plus efficace que le traitement conventionnel (Caster et al., 2017; Havel, 2016; Wolfram et al., 2015).

L'administration de doxorubicine liposomale (Doxil®) chez l'homme augmente de 300 fois la surface de l'aire sous la courbe et réduit la clairance de 250 fois par rapport au même médicament sous forme libre (Havel, 2016). Ainsi, l'encapsulation liposomale améliore l'efficacité thérapeutique de la doxorubicine (cancer de l'ovaire ou sarcome de Kaposi lié au SIDA) ou est équivalente (myélome multiple et cancer du sein ; Nichols et Bae, 2014).

De plus, le Doxil® présente également une meilleure tolérance globale, bien qu'une légère toxicité cutanée soit observée du fait de son temps de circulation prolongé (Soloman and Gabizon, 2008).

2.1.3) Ciblage

Dans la majorité des cas les nano-médicaments utilisent un « ciblage passif » impliquant l'accumulation non spécifique dans les tissus malades, souvent des tumeurs. Cependant un « ciblage actif » peut être obtenu en liant un ligand (protéines, anticorps) à la surface des NP. Celui-ci est choisi de manière à se fixer spécifiquement à certains récepteurs exprimés par les cellules malades, induisant une augmentation de l'accumulation et de l'absorption intracellulaire du PA par les cellules ou tissus ciblés (Ventola, 2012; Bobo et al., 2016; Ventola, 2017).

2.3) Marché des nano-médicaments

Entre 1995 et 2017, 50 nano-médicaments ont été approuvés par la FDA et sont utilisés en clinique (Figure 21 A, B) et un nombre plus important est encore en cours d'essais cliniques (Figure 21 C et D ; Ventola, 2012; Bobo et al., 2016; Havel, 2016; Caster et al., 2017; Ventola, 2017 Ragelle et al., 2017; Choi et Han, 2018; Mukhopadhyay, 2019).

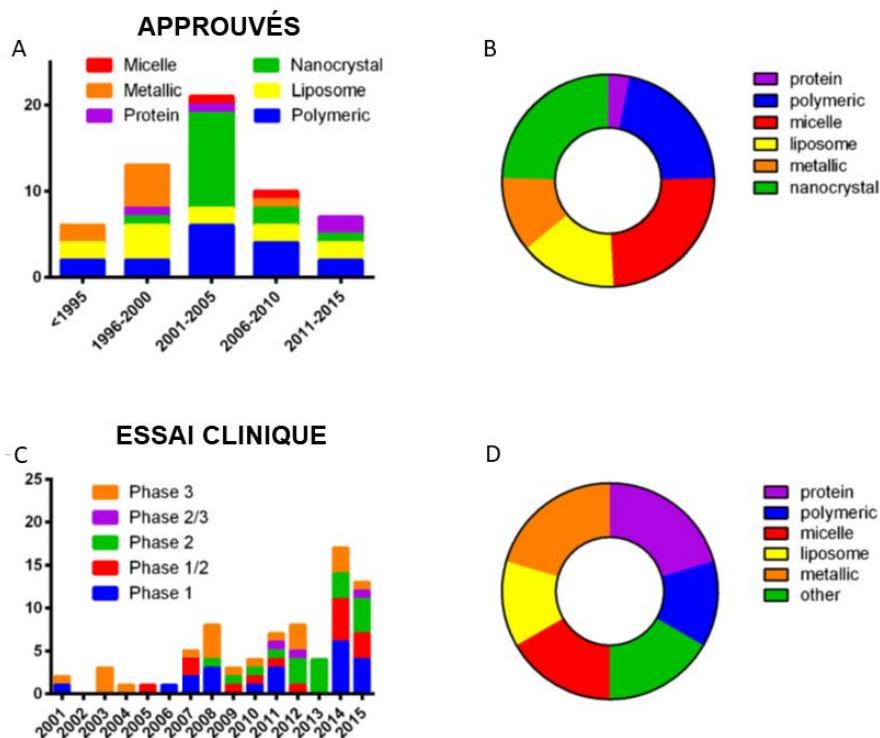


Figure 21 : Représentation des différents types de NP actuellement sur le marché (A, B) ou en cours d'essai clinique (C, D) en fonction des années (A, C) ou globalement (B et D). D'après Ventola, 2012; Bobo et al., 2016; Ragelle et al., 2017.

Une liste complète des nano-médicaments approuvés par la FDA a été publiée récemment (Ventola, 2017). Les nanocristaux, les formulations micellaires, polymériques et liposomales sont largement représentés parmi les nano-médicaments (Figure 21.A et B) approuvés mais d'autres NP sont utilisées ou en phase de développement dont les protéines et les NP inorganiques (métaux et oxyde de métaux) soulignant ainsi une nouvelle tendance (Figure 21). Les protéines et les NP inorganiques concentrent quasiment 50% des essais cliniques alors qu'ils représentent moins de 25% des nano-médicaments actuellement approuvés (Bobo et al., 2016; Caster et al., 2017; Ragelle et al., 2017; Sainz et al., 2015).

2.4) Développement et essai clinique

De nouveaux nano-médicaments font l'objet d'investigations cliniques chaque année, mais la plupart sont des nano-formulations de substances actives précédemment approuvées. La plupart des nano-médicaments en sont aux tous premiers stades de développement, 7 802 articles comportant les termes «nanoparticles treatment » ont été publiés en 2018, ce chiffre n'excédait pas 100 avant l'an 2000, soulignant l'intérêt récent pour les nano-médicaments. En mai 2019, 67 essais cliniques incluant le terme « nano » étaient répertoriés en phase « de recrutement » ou « active » sur le site ClinicalTrials.gov («ClinicalTrials.Gov»). De nombreuses études présentent les principaux essais cliniques en cours (Ragelle et al., 2017; Ventola, 2017). Les années 2014 et 2015 ont connu le plus grand nombre de nano-médicaments entrant dans des essais cliniques suggérant une augmentation à venir des nano-médicaments approuvés par la FDA (Bobo et al., 2016). Les principales applications des essais cliniques actuellement en cours portent sur les nano-médicaments anticancéreux et antimicrobiens, mais de nombreuses formulations sont également développées dans d'autres domaines tels que les maladies auto-immunes, l'anesthésie, les troubles métaboliques, les affections ophtalmiques, les maladies neurologiques et psychiatriques (Caster et al., 2017). Bien que la majorité des nano-médicaments approuvés par la FDA reposent sur un ciblage passif, certains médicaments de nouvelle génération, en phase clinique, utilisent des approches de ciblage actif (Bobo et al., 2016).

3) Nanoparticules et stress Oxydant

La revue « Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nano-medicine » publiée en 2019 présente les nanothérapies liées aux ERO pour de nombreuses pathologies (Yang et al., 2019). Deux grands types d'approches utilisent les NP dans un contexte de stress oxydant : 1) génération d'ERO par les NP pour augmenter le stress oxydant ou 2) utilisation des propriétés antioxydantes de certaines NP pour réduire le stress oxydant.

La première approche a été notamment décrite dans le cadre de thérapies anticancéreuses. En effet, certaines NP sont utilisées pour générer des ERO au sein des cellules cancéreuses et ainsi réduire la tumeur, comme par exemple les NP d'oxydes de titane (TiO₂) ou de silice (SiO₂) qui sous irradiation par UV (thérapie photodynamique) catalyse la transformation de l'O₂ en O₂•⁻ et de l'H₂O en •OH (Yang et al., 2019). D'autres pathologies sont évoquées telles que des pathologies cérébrales, cardiovasculaires ou liées à l'inflammation dont les infections bactériennes.

La seconde approche repose sur les capacités antioxydantes de certaines NP, qui miment notamment l'activité de certaines enzymes endogènes telles que la SOD et la CAT (Salvemini et al., 2002; Yang et al., 2019). La découverte d'activités mimant la SOD par les dérivés de fullerène a été considérée comme l'élément déterminant du développement de nanozymes (pour nano – enzymes ; Ali et al., 2008). En 2004, une étude a démontré que les régions déficientes en électrons de la sphère C₆₀ pourraient stabiliser électrostatiquement l'O₂•⁻ favorisant sa dismutation (Ali et al., 2004). Les capacités uniques de détoxification d'ERO par les dérivés de fullerène ont été largement utilisées pour diverses applications antioxydantes telles que la neuroprotection et le traitement anti-âge (Yang et al., 2019). D'autres nanomatériaux inorganiques tels que le bleu de Prusse, le platine et l'or ont présenté des activités antioxydantes par l'élimination des ERO (Yang et al., 2019). Certains oxydes de métaux présentent également des capacités antioxydantes telles que l'oxyde de nickel (Yang et al., 2019) et les oxydes d'Yttrium (Yang et al., 2019). La nouvelle génération de nanozymes ayant une activité antioxydante correspond aux NP d'oxydes de cérium (CeO₂), qui concentrent la majorité des recherches précliniques dans le développement de traitements antioxydants (Celardo et al., 2011; Das et al., 2013; Karakoti et al., 2010; Li et al., 2013a; Nelson et al., 2016; Shcherbakov et al., 2015).

4) Nanoparticules et ischémie

Des études ont mis en évidence un effet antioxydant des nanoparticules sur des modèles d'ischémies *in vitro* et *in vivo* (Tableau V).

La première étude, publiée en 2009 (Reddy and Labhasetwar, 2009), a permis d'encapsuler l'enzyme SOD dans un recouvrement PLGA (poly(acide lactique co-glycolique)). Les auteurs ont dans un premier temps mis en évidence que la libération de la SOD était progressive *in vitro* puis ils ont testé l'efficacité des NP sur un modèle d'ischémie *in vivo* (MCAO : occlusion de l'artère cérébrale moyenne ; durée de l'occlusion : 2h). La quantité de NP mesurée dans le cerveau est 13 fois plus importante lorsque l'administration des NP est effectuée en intra-carotidien (0,18mg soit ≈ 1,5% de la dose injectée) comparé aux injections intraveineuses ou intrajugulaires. Les NP étaient principalement localisées dans le cortex (et le striatum) de l'hémisphère ipsilatéral, ce qui concorde avec la zone de lésion. Cette étude a démontré que les NP-SOD diminuent de 65% le volume de lésion et améliorent le taux de survie et le score neurologique. De plus, les NP-SOD diminuent la perturbation de la BHE, l'œdème cérébral, l'apoptose et les EROs.

Une étude plus récente publiée en 2013 a également utilisé des NP chargées en SOD mais en ajoutant un ciblage cérébral (Yun et al., 2013). Différentes NP ont été utilisées pour transporter la SOD : des liposomes, un recouvrement PBCA (polybutylcyanoacrylate), et un recouvrement PLGA. Le ciblage vise les récepteurs NMDA via l'anticorps NR1. Deux modèles ont été utilisés pour tester l'efficacité des NPs : une culture de neurone corticale primaire soumis à une privation en oxygène et glucose (OGD) et un modèle murin d'ischémie par ligature de l'artère carotide externe pendant 1h. L'OGD réduit la survie des neurones corticaux primaires de 65%, en présence de NP-SOD ce taux diminue à 35% et à 15% avec les particules ciblantes, démontrant une protection des NP contre l'OGD. Environ 1% de la dose de NP injectée était retrouvé dans le cerveau lors d'une injection intra carotidienne (0,1% par intraveineuse), ce taux augmente à 2% en cas de ciblage et les NP se retrouvent concentrées au niveau de l'hippocampe. Les NPC permettent une réduction du volume de lésion ($\approx 30\%$ pour les NP non ciblantes et $\approx 65\%$ pour les ciblantes) ainsi qu'une amélioration du score neurologique et du taux de survie. Ces effets sont associés à une diminution des marqueurs de l'inflammation dont les cytokines TNF α , IL1, TGF β et le taux de caspases 3, mais également une réduction des marqueurs du stress oxydant dont les ERO et les TBARS. Sur l'ensemble de ces résultats, l'effet bénéfique des NPC ciblantes est plus important que celui des NPC non ciblantes soulignant l'intérêt du ciblage. De plus, l'administration des NP même tardive, jusqu'à 8h après l'ischémie, diminuait encore significativement le volume des lésions de 20%.

Un article a rapporté une diminution de l'infarctus cérébral et du stress oxydant par des nanoparticules de fullerène sur un modèle d'ischémie (MCAO; durée de l'occlusion : 90min) chez le rat (Vani et al., 2016). Les NP de fullerène ont été administrées à 1 mg/kg en intra-péritonéal 30min avant l'ischémie ou immédiatement après l'ischémie. Le prétraitement a réduit le volume de lésion de 53% et le post-traitement de 81%. Ces effets étaient associés à une diminution du MDA, des nitrates et une récupération partielle du glutathion et de la SOD (Vani et al., 2016).

Une autre étude parue en 2016 présente les capacités antioxydantes de NP de mélanine (MeNP) PEGylées et leur application pour protéger le cerveau contre les lésions induites par l'ischémie (Liu et al., 2017a). Les auteurs ont mis en évidence, en milieu acellulaire, une activité SOD-Like, CAT-Like et également une capacité à capter les radicaux $\bullet\text{OH}$, ONOO- et $\bullet\text{NO}$ par ces MeNP. Puis, le potentiel protecteur des MeNP a été mis en évidence sur une lignée de neurones dans un modèle d'hypoxie (CoCl $_2$ + AMA : Antimycine A). La production d'ERO induite par l'AMA (génération d'O $_2\bullet$ -) et le CoCl $_2$ est réduite par les MeNP. De plus, les MeNP préviennent l'augmentation de Bax (pro-apoptotique) et de Bcl2 (anti-apoptotique) induite par le CoCl $_2$ tout en ne provoquant pas de cytotoxicité en condition physiologique. La lignée neuronale a ensuite été traitée par le LPS (lipopolysaccharide) afin d'induire une inflammation. Dans ces conditions, les MeNP permettent de réduire la COX-2, le TNF α ,

IL1 mais également les ERO et ERN. Enfin, les MeNP ont été évaluées dans un modèle d'ischémie chez le rat (MCAO de 90 minutes, injection intraventriculaire de 80µg de MeNP), et ont pu diminuer le volume de lésion (50%) et la production d'O₂•⁻. Aucune toxicité n'a été observée chez les animaux après injection de MeNP.

Tableau V : Étude démontrant un effet antioxydant des NP sur des modèles d'ischémie cérébrale.

| Induction | [NPC] | Coating NPC | Taille NPC | Localisati on | Résultats | Ref |
|--|--|---|---|--|--|------------------|
| MCAO 2h | SOD-NP 35mg/kg 10-20 000U/kg | PLGA | 81nm 291 nm | Ipsi- latérale Cortex et Striatum | Réduction des lésions induite par l'ischémie/ reperfusion ↓ volume de lésion de 65%, apoptose, ERO, et perturbation BHE ↑ Taux de survie, score neurologique | (Reddy, 2009) |
| OGD : Oxygen Glucose Deprivation 24h Modèle ischémie murin 1h | 4 à 20 000U/ kg Chargé en SOD | Liposome PBCA PLGA Ciblé ou non (NMDA) | Lipo 160nm PBCA : 330nm PGLA : 330nm | 1% dans le cerveau 2% avec ciblage (NMDA par Ac NR1) | Protection neuronale Survie OGD : 35% + NPsSOD : 65% + Ciblage : 85% ↓ volume lésion (60%), score neurologique et marqueur inflammation (TNFα, IL1, TGFB) ↓ ERO (76%) TBARS (77%) et caspase3 ↑ taux de survie | (Yun, 2013) |
| Lignée Neuro 2A AMA 10µg/mL LPS 100ng/mL CoCl ₂ 0,3mM Modèle ischémie (rat) MCAO 90min | 5 à 640µg/mL 80µg/rat (0,35mg/k g)* | Mélanine NP PEG | 120n m | - | Mécanisme multi oxydant de MeNP et application pour l'ischémie ↓ O ₂ • ⁻ (SOD-Like) H ₂ O ₂ (CAT-Like), OH, NO et ONOO- ↓ O ₂ • ⁻ , ERO, prévient ↑ Bax et ↓ Bcl-2 induit par CoCl ₂ ↓ COX-2, ERO, ERN, TNFα et IL-1 induit par LPS ↓ volume lésion de 50% et O ₂ • ⁻ Absence de tox vitro/ vivo | (Liu, 2017) |
| Modèle d'ischémie (rat) MCAO 90 min | 1mg/kg 30 min avant (Av) ou après (Ap) ischémie | Fullerène | - | - | ↓ volume de lésion de 53 (Av) à 81% (Ap) MCAO ↑ MDA (45%) et nitrate (25%) et ↓ GSH (19%) et SOD (52%) ↓ MDA : 58% (Av) et 17% (Ap) ↓ Nitrate: 38% (Av) et 21% (Ap) ↑ GSH : 19% (Av) et 21% (Ap) ↑ SOD : 52% (Av) et 55% (Ap) | (Vani, 2016) |

Abréviation : MCAO : occlusion de l'artère cérébrale moyenne ; PLGA : poly(lactic-co-glycolic acid) ; OGD : Déprivation en oxygène et glucose ; PBCA : polybutylcyanoacrylate ; TBARS : Thiobarbituric acid reactive substances ; AMA : Antimycine A. * Données non fournies et calculées à partir des données de l'article (quantité ou concentration molaire et poids moyen des animaux)

5) Les Nanoparticules d'oxyde de cérium

5.1) Généralités

Le cérium, découvert en 1803 par Martin Heinrich Klaproth, est un élément chimique de symbole Ce et de numéro atomique 58, il fait partie de la famille des lanthanides. Le cérium est le métal le plus abondant du groupe des terres rares (48 parties par million), il est actuellement utilisé dans l'industrie notamment en tant que catalyseur dans de nombreux processus et produits industriels. Ses applications comprennent le polissage du verre, la réduction des émissions de particules des moteurs diesel, le traitement des contaminants de l'environnement, les fours, la pierre à briquet, et en protection contre l'ionisation (Mamontov et al., 2000; Sun et al., 2012). Plus récemment, le cérium et plus précisément l'oxyde de cérium (CeO_2) a trouvé une application en nano-médecine sous forme de nanoparticules d'oxyde de cérium (NPC).

Le cérium peut exister dans deux états d'oxydation : Ce^{3+} et Ce^{4+} et peut être présent sous deux formes d'oxyde différentes : CeO_2 (Ce^{4+}) et CeO_3 (Ce^{3+}). A l'échelle nanométrique, le réseau d'oxyde de cérium a une structure cristalline cubique de type fluorite et les deux types d'ions coexistent à sa surface (Figure 22). Les NPC peuvent avoir différentes morphologies (sphériques, cubiques, polyédriques) qui dépendent notamment de la technique de synthèse employée (Das et al., 2013).

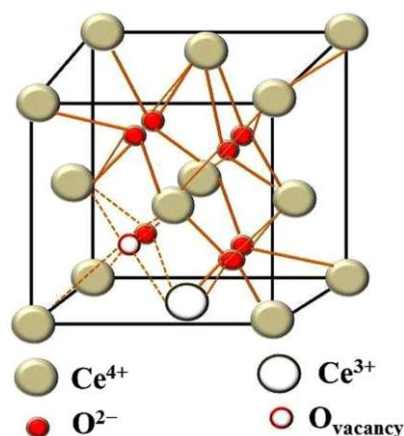


Figure 22 : Composition et structure des NPC.

Présence des ions Ce^{3+} , Ce^{4+} et de place libre pour l'oxygène ($\text{O}_{\text{vacancy}}$). D'après Khan et al., 2017.

La taille des NPC est une caractéristique importante due à l'effet de surface évoqué précédemment. Une première étude publiée en 2013 a démontré que les NPC les plus petites (3,8nm) présentent les

meilleures capacités antioxydantes (Lee et al., 2013b). De plus, nos partenaires de l'unité MSC à l'Université Paris Diderot ont abouti à la même conclusion : les NPC de 5nm possèdent les meilleures activités antioxydantes comparées aux NPC de 8, 23 et 28nm (Baldim et al., 2018). Enfin une étude a comparé des NPC de 8 et 58nm, a également mis en évidence de meilleures capacités antioxydantes des NPC de 8nm (Thai et al., 2015).

Bien qu'une étude ait démontré une plus grande cytotoxicité des NPC de petites tailles (25nm) comparé à des NPC de 300nm (Kumari et al., 2014); la plupart des études n'ont pas mis en évidence d'impact de la taille des NPC sur leur cytotoxicité, en soulignant aucune modification de la toxicité en fonction des tailles de NPC étudiées : 3-5nm vs 6,6 nm (Peng et al., 2014a), 6nm vs 12 nm (Schubert et al., 2006) et 15, 25 , 30 et 40nm (E.-J. Park et al. 2008 ; Karakoti et al., 2010; Alili et al., 2011, 2013; Lee et al. 2013).

5.2) Recouvrements des NPC

Le recouvrement induit une répulsion stérique entre les NPC permettant de diminuer leur interaction, notamment à pH physiologique, limitant ainsi leur agrégation. Le recouvrement des NPC est par conséquent nécessaire pour leur utilisation en condition physiologique que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

Ainsi, le **recouvrement** permet de diminuer leur agrégation dans l'eau et les milieux biologiques induisant par conséquent une augmentation de la biocompatibilité (Alili et al., 2013; Karakoti et al., 2010; Lee et al., 2013b). De plus, le recouvrement limite également l'opsonisation des NPC, les rendant ainsi plus furtives (Alili et al., 2013; Karakoti et al., 2010). Plusieurs revues présentent les principaux matériaux utilisés pour recouvrir les NPC (Das et al., 2013) dont les PEG (Karakoti et al., 2010), le dextran (Alili et al., 2013), l'acide polyacrylique ou PAA (Asati et al., 2010) ou l'acide citrique (Yokel et al., 2013). Cependant, ces recouvrements affectent les propriétés physicochimiques des NPC : la taille des NPC est comprise entre 3 et 55nm avant recouvrement (mesurée par TEM) et augmente de 5 à 150nm après recouvrement (mesurée par DLS). De plus, le potentiel zêta des NPC après recouvrement varie de -57mV à +46mV (Das et al., 2013). Ces modifications physicochimiques peuvent affecter trois caractéristiques principales : l'effet antioxydant, l'internalisation et la toxicité des NPC (Chen and Stephen Inbaraj, 2018; Singh et al., 2018).

Des études ont mis en évidence un effet de la charge sur les systèmes biologiques (Celardo et al., 2011) notamment sur la **localisation et l'internalisation** des particules (Asati et al., 2010; Vincent et al., 2009). L'internalisation cellulaire se fait en deux étapes : fixation sur la membrane cellulaire et

éventuellement internalisation (Chen and Stephen Inbaraj, 2018). La première étape est principalement médiée par la charge des NPC et la charge des membranes par des interactions électrostatiques (Fröhlich, 2012). La surface cellulaire est majoritairement chargée négativement, suggérant une meilleure internalisation des NPC chargées positivement (Chen and Stephen Inbaraj, 2018). En effet, une étude a comparé 3 recouvrements de différentes charges (PAA chargé négativement ou positivement et Dextran neutre), et a démontré que le recouvrement PAA chargé positivement présentait une meilleure internalisation dans différents types cellulaires (HEK, H9c2, A549 et MCF-7) bien qu'elle dépende également du type cellulaire (Asati et al., 2010). La meilleure internalisation des NPC chargées positivement a été confirmée sur les cellules A549 par une autre étude (Vincent et al., 2009). De plus, une importante colocalisation avec les lysosomes a été observée pour les NPC chargées positivement et négativement (Asati et al., 2010). Cependant, d'autres études ont démontré une meilleure internalisation des NPC chargées négativement (Patil et al., 2007), suggérant que les NPC chargées négativement peuvent se fixer sur des sites spécifiques cationiques et former des agglomérats qui faciliterait l'internalisation par endocytose (Patil et al., 2007; Renu et al., 2012).

Enfin, une autre étude a comparé deux recouvrements PAA et citrate sur des NPC de 7nm, ils n'ont pas détecté de différence concernant l'internalisation des NPC, ni sur leur localisation. En revanche, ils ont mis en évidence une agrégation et une **toxicité** des NPC-Citrate (Ould-Moussa et al., 2013). Le recouvrement des nanoparticules influence la formation de couronne protéique dans les milieux *in vitro* ou *in vivo*, qui détermine l'internalisation cellulaire et la clairance des NPC (Lynch and Dawson, 2008).

L'ensemble de ces données souligne l'importance de la taille des NPC et du choix du recouvrement pour l'utilisation de NPC *in vitro* et *in vivo*.

5.3) Capacités antioxydantes des NPC

L'utilisation du cérium pour ses propriétés antioxydantes est un domaine très récent. Ainsi pour les termes « antioxydant cerium » la base de données NCBI recense moins de 10 articles jusqu'en 2006. Ce nombre augmente progressivement depuis, avec une vingtaine de publications par an sur la période 2010-2011, puis une trentaine en 2012, ce chiffre s'étant stabilisé à une quarantaine entre 2013 et 2017 pour finalement atteindre son maximum à 56 publications en 2018.

L'atome de cérium a la capacité d'ajuster sa configuration électronique entre Ce^{3+} (réduit) et Ce^{4+} (oxydé) conférant des propriétés d'oxydoréduction (redox) aux NPC (Suzuki et al., 2001; Xu and Qu,

2014). De plus, les NPC présentent également des sites d'occupation de l'oxygène permettant de catalyser une réaction du type Fenton (« Fenton-like ») à partir du peroxyde d'hydrogène.

Le ratio entre Ce^{3+} et Ce^{4+} est un paramètre important, qui détermine l'activité antioxydante des NPC (Deshpande et al., 2005). Le rapport Ce^{3+}/Ce^{4+} peut varier considérablement en fonction des méthodes de synthèse, allant de 9% à 65% de Ce^{3+} (Baldim et al., 2018; Das et al., 2012). Les techniques utilisées pour déterminer le rapport Ce^{3+}/Ce^{4+} comprennent la spectroscopie photoélectronique à rayons X (Zhang et al., 2006), la spectroscopie d'absorption des rayons X (Dutta et al., 2006), la spectroscopie à résonance paramagnétique électronique (Deshpande et al., 2005) et la spectroscopie UV-Visible (Kuchma et al., 2010). La taille des NPC est également un facteur clé pour leur activité antioxydante en raison de l'effet de surface (Zhang et al., 2006).

De nombreuses études ont évalué les capacités antioxydantes des nanoparticules de cérium (Tableau VI). Ces capacités antioxydantes des NPC sont liées à différents mécanismes : 1) les NPC peuvent mimer l'action d'enzymes antioxydantes dont la SOD (Baldim et al., 2018; Heckert et al., 2008; Korsvik et al., 2007) et la CAT (Baldim et al., 2018; Pirmohamed et al., 2010), 2) les NPC ont la capacité de capter directement les ERON tels que le $\bullet NO$ (Dowding et al., 2012), ONOO- (Dowding et al., 2013) et $HO\bullet$ (Xue et al., 2011).

Tableau VI : Activité antioxydante des NPC en milieu acellulaire.

| Induction/ Mesure | [NPC] | Taille NPC | Résultats & Observations | Ref |
|------------------------------------|-------------------|---------------------|--|------------------|
| H_2O_2 2 à 100mM | 100 à 300 μ M | 4 et 6nm | Activité CAT (Fonction du taux de Ce^{4+}) | Pirmohamed, 2010 |
| H_2O_2 0,1 à 1,25M | 15 à 750nM | 4 et 6nm | Activité SOD H_2O_2 oxyde NPC (\downarrow SOD et Ce^{3+} et \uparrow Ce^{4+}) $\downarrow O_2$ et H_2O_2 | Heckert, 2008 |
| Réduction du Ferricytochrome C | 5 à 60nM | 3-5 nm 5-8nm | Activité SOD Activité fonction de la taille et du taux de Ce^{3+} | Korsvik, 2007 |
| SNAP* 200 μ M | 50 μ M – 1M | 3-8nm | $\downarrow NO\bullet$ par Ce^{4+} | Dowding, 2012 |
| ONOO- 20 μ M H_2O_2 100mM | 0,1 à 1mM | 3-8nm | \downarrow ONOO- \downarrow 3 Nitrotyrosine (30%) | Dowding, 2013 |
| Méthyl Violet | 1, 10 et 100mM | 5-10 nm 10-20 nm | $\downarrow HO\bullet$ (Fonction taille et Ce^{3+}) | Xue, 2011 |
| H_2O_2 | 200 μ M | 5, 8, 23 et 28nm | Activité CAT et SOD Activité fonction de la taille et du taux de Ce^{3+} | Baldim, 2018 |

*SNAP : S-nitroso-N-acetylpenicillamine, donneur de $\bullet NO$

5.3.1) Activités Antioxydantes « Enzymatiques » des NPC

5.3.1.1) Activités de type SOD et CAT

- Activité de type SOD

En 2007, une première étude a mis en évidence l'activité SOD-like des NPC et sur la base du mécanisme de réaction connu pour la SOD, il a été proposé une réaction de dismutation du superoxyde par les NPC (Korsvik et al., 2007 ; Figure 23 A et B). En 2011, Celardo et coll. proposent un mécanisme plus complet de l'activité SOD-like des NPC (Celardo et al., 2011 ; Figure 23 C).

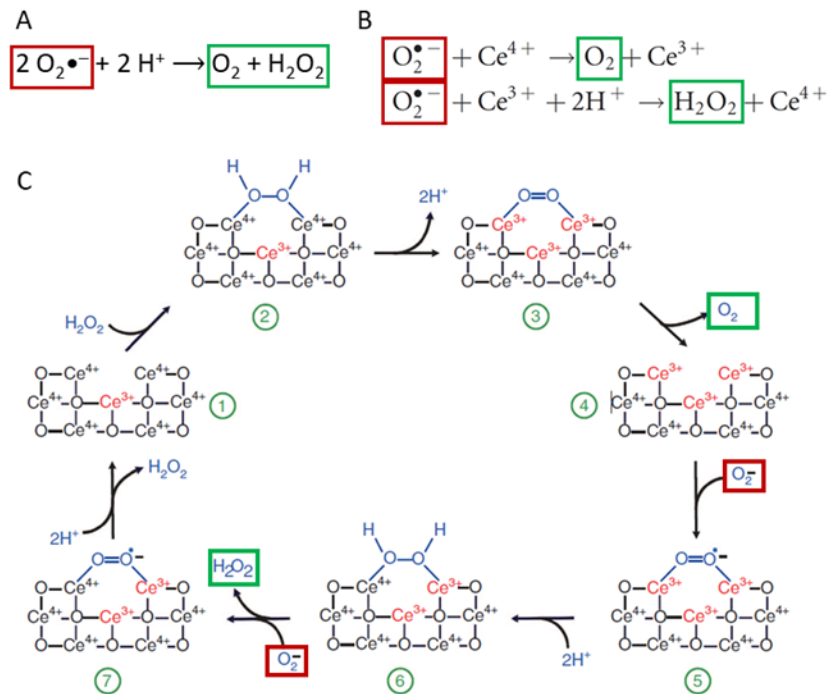


Figure 23 : Propositions de mécanismes de l'activité SOD-like des NPC (dismutation de l'O₂^{•-}) : (A) Réaction catalysée par la SOD ; (B) Mécanisme proposé par Korsvik et al. 2007 ; (C) Mécanisme proposé par Celardo et al., 2011.

- Activité de type catalase

L'activité CAT-like des NPC a été démontrée pour la première fois en 2010 (Pirmohamed et al., 2010 ; Figure 24 A) et un mécanisme a été proposé en 2011 (Celardo et al., 2011 ; Figure 24 B).

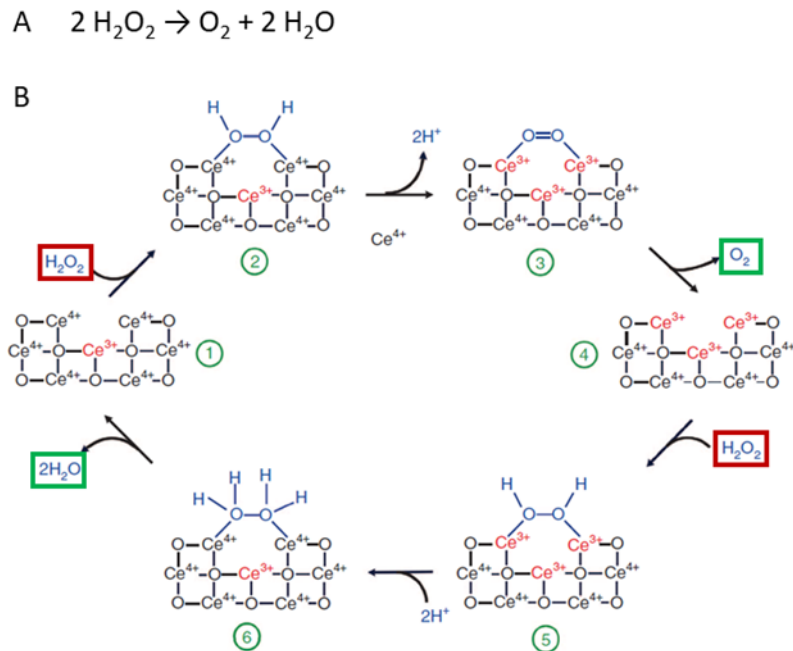


Figure 24 : Proposition de mécanisme de l'activité CAT-like des NPC (dismutation de l' H_2O_2). (A) Réaction de la catalase. (B) Mécanisme de l'activité CAT-like catalysée par le cérium (D'après Celardo et al., 2011).

- Combinaison de l'activité de type CAT et SOD

Lorsque les NPC exercent leur activité SOD-like, elles produisent de l' H_2O_2 qui pourrait devenir plus délétère en se transformant en radical $\bullet\text{OH}$ grâce à la réaction de Fenton. Toutefois, les NPC ayant également une activité CAT-like, l' H_2O_2 généré par la SOD peut donc être converti en H_2O et O_2 .

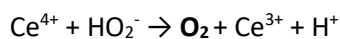
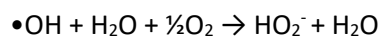
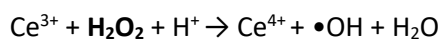
- Facteurs influençant les activités de type SOD et CAT

Selon certaines études, de nombreux facteurs tels que la taille des NPC (Baldim et al., 2018), le rapport $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ (Dutta et al., 2006; Korsvik et al., 2007; Xue et al., 2011), certains tampons (Singh et al., 2010), ainsi que le pH de la suspension (Alili et al., 2011) pourraient modifier les propriétés de types SOD et CAT des NPC.

Des études ont montré que des taux plus importants de Ce³⁺ (ratio Ce³⁺/Ce⁴⁺ élevé) induisaient plutôt une activité SOD (Heckert et al., 2008; Korsvik et al., 2007) et une élimination d'•OH (Xue et al., 2011) tandis que des taux plus importants de Ce⁴⁺ (ratio Ce³⁺/Ce⁴⁺ faible) orientaient vers une activité CAT (Clark et al., 2011; Pirmohamed et al., 2010) et une élimination de NO• plus marquée (Estevez et al., 2011; Niu et al., 2007; Niu et al., 2011; Dowding et al., 2012). Cependant, une étude récente réalisée par nos collaborateurs du laboratoire Matières et Systèmes Complexes de l'Université Paris Diderot a observé que les activités SOD et CAT dépendent uniquement du taux de Ce³⁺ et de la taille des NPC (Baldim et al., 2018). En utilisant des NPC de 5, 8, 23 et 28nm avec des taux de Ce³⁺ variant de 9 à 43% ils ont montré que plus la particule est petite et plus son taux de Ce³⁺ est important plus les activités SOD et CAT sont élevées.

5.3.1.2) Autres activités enzymatiques

Certaines études ont montré que les NPC avaient une activité **peroxydase-like** (Heckert et al., 2008; Jiao et al., 2012). Cette activité est assez répandue pour les oxydes à base de métaux de transition, car elle est principalement dérivée des ions métalliques qui ont une activité catalytique utilisant l'H₂O₂ comme substrat par un mécanisme similaire à la réaction de Fenton (Gao et al., 2007). Le mécanisme proposé est le suivant :



Des études ont également montré que les NPC avaient une activité **phosphatase-like**. En effet, les NPC peuvent hydrolyser les liaisons ester de phosphates de nombreuses molécules (Buettner, 2011; Patil et al., 2007) et déphosphoryler des phospho-peptides (Tan et al., 2008). Une étude a confirmé cette activité en démontrant que les NPC pouvaient hydrolyser des esters de phosphate sur de nombreuses biomolécules hormis l'ADN (Kuchma et al., 2010).

L'ensemble de ces données confirme la capacité des NPC à mimer l'action des enzymes antioxydantes. Dans la partie suivante la capacité des NPC à capter directement certaines ERO sera détaillée.

5.3.2) Capture des ERO

- NO

Une équipe a montré la capacité des NPC à capter directement le monoxyde d'azote (NO) dans des conditions physiologiquement pertinentes (Dowding et al., 2012). L'élimination du NO par les NPC semble être plus importante lorsque le taux de Ce⁴⁺ est élevé. Sur la base du mécanisme de dismutation du NO par les porphyrines de fer (Wayland et al., 1974), un mécanisme a été adapté et proposé pour le Cérium : $Ce^{4+} + \bullet NO \rightarrow Ce^{4+} + NO \rightleftharpoons Ce^{3+} + NO^+$.

- ONOO-

Le groupe ayant prouvé la capacité des NPC à piéger le NO a également dévoilé la capacité des NPC à dégrader les radicaux peroxy-nitrites l'année suivante (Dowding et al., 2013). L'effet semblerait indépendant du ratio Ce³⁺/Ce⁴⁺.

- •OH

Une autre étude a mis en évidence une preuve directe de piégeage des radicaux hydroxyles •OH par des NPC par un système photométrique simple (Xue et al., 2011). Pour cela ils ont fait réagir du violet de méthyl (VM) avec des radicaux hydroxyles induisant une diminution de l'absorption du VM. Or, la présence de NPC protégeait le VM en réagissant de manière compétitive avec les radicaux •OH induisant une plus faible diminution de l'absorption du violet de méthyl. Cette activité semble dépendante de la taille et de la teneur en Ce³⁺ des NPC (Xue et al., 2011).

L'ensemble de ces données a été obtenu *in vitro* en milieu acellulaire mais sont une première preuve de l'utilisation possible des NPC sur des modèles de pathologies liées au stress oxydant *in vitro* et *in vivo*. Cependant, les NPC s'agrègent à pH physiologique par l'intermédiaire des interactions préalablement décrites. Les NPC ne peuvent donc pas être utilisées telles quelles en condition *in vitro* ou *in vivo*, mais doivent préalablement être recouvertes.

5.3.3) Capacités autorégénératrices des NPC

Les NPC présentent un double rôle de catalyseur d'oxydation et de réduction entre CeO₂ et CeO_{2-x} (Dutta P, 2006 Chem Mater). Ces propriétés inhérentes aux NPC, dues à des sites d'inoccupation de l'oxygène, sont résistantes aux dommages des radicaux libres permettant une auto-régénération continue sans produire de produits secondaires délétères (Dowding et al., 2012; Dutta et al., 2006;

Heckert et al., 2008; Pirmohamed et al., 2010). Les mécanismes cyclique des activités de type SOD et CAT présentés par Celardo et al, en 2011 peuvent également expliquer les propriétés autorégénératives des NPC (Figure 23 et 24)

Certaines études ont mis en évidence un changement de couleur des NPC en présence d'H₂O₂, ce qui pourrait indiquer que le Ce³⁺ (incolore) pourrait être utilisé comme antioxydant pour réagir avec les radicaux libres générés par H₂O₂ et se transformer en Ce⁴⁺ (orange ; Figure 25 ; Das et al., 2007; Xu et Qu, 2014). Au bout de quelques jours, la couleur est revenue à l'état initial reflétant une régénération des NPC. Une étude a démontré que cette activité auto-régénératrice dépend du pH. Ainsi à pH physiologique et basique l'activité était conservée, en revanche à pH acide (pH=4) cette auto-régénération n'était plus observée (Perez et al., 2008). De plus, les mécanismes cycliques de l'activité de type SOD et CAT pourraient expliquer les propriétés autorégénératives des NPC (Celardo et al., 2011; Das et al., 2013; Karakoti et al., 2010).

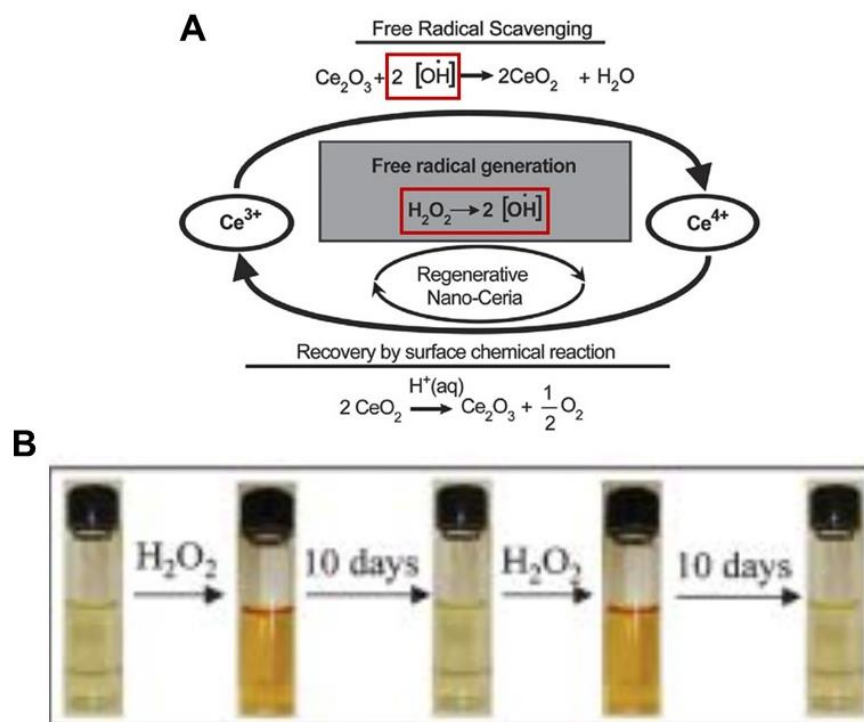


Figure 25 : Autorégénération des NPC.

(A) : Dégradation de •OH et hypothèse quant à leur capacité autorégénérative (Xue, 2011 ACS). (B) Modification de couleur de la suspension de NPC après ajout de l'H₂O₂ qui pourrait indiquer la modification du Ce³⁺ en Ce⁴⁺ puis retour à l'état initial. D'après Perez et al., 2008 et Das et al., 2007.

5.4) Evaluation de l'activité antioxydante des NPC *in vitro*

De nombreuses études ont mis en évidence un effet antioxydant des NPC sur des modèles *in vitro* variés (Tableau VII). L'effet antioxydant est associé en fonction de l'inducteur à un effet protecteur : anti-tumorale, anti-apoptotique, neuroprotecteur.

Tableau VII : Études évaluant l'effet antioxydant *in vitro* des NPC.

| Modèle | Induction | [NPC] | Recouvrement NPC | Taille NPC | Localisation | Résultats | Ref |
|----------------------|---|--|--------------------------------------|------------------|--|---|------------------------------------|
| Cellules cancéreuses | Radiation 0-10Gy | 0-5µM (0-860 ng/mL)* | - | 2-5nm | - | Protection contre radiation Ø toxicité (jusqu'à 10mM) ↑ viabilité ↓ apoptose | Tarnuzzer, 2005 |
| | Xenogreffe | 50, 150 et 300µM (8,6 ; 26 et 52µg/mL)* | Dextran | 5nm | Intra-cellulaire | ↓ invasion tumorale, métastase, carbonylation protéique Ø toxicité cellules stromales Toxique, pro-apoptotique pour mélanome ↓ poids et volume tumeur | Karakoti, 2007; Alili, 2011 |
| | pH | 0,2 à 5µM (34,4 à 860ng/mL) * | Dextran | 5, 12, 14, 100nm | Récepteurs Folate de cellule cancéreuse | Activité oxydase fonction de la taille et du pH : optimale à pH 4 et avec des NPC de 5nm Ciblage actif : NPC – Folate se fixe sur les récepteurs folates des cellules cancéreuse | Asati, 2009 |
| | H ₂ O ₂ | 0,17 à 1,7µg/mL | - Nanoscale Corp | 16nm | Intra-cellulaire | Protection contre l'apoptose médié par le stress oxydant SOD-like, Ø toxicité (hémolyse, cytolyse) ↓ Apoptose et Caspase-3 | Clark, 2011 |
| | tBHP 0,5mM | 10µM (1,7µg/mL) * | PSPM et PMETAC | 15nm | Intra-cellulaire Endosome/ Lysosome/ Lipide | ↓ Internalisation par recouvrement Internalisation rapide (10h), énergie- dépendante (Macropinocytose) ↓ ERO | Qiu, 2015 |
| | Hyper-glycémie Glucose 25mg/mL | 100mM (17,2mg/mL)* | - Navarrean Nenoproduct Tech. | 5-19nm | - | Effet protecteur ↑ Survie, Bcl2 et thiols totaux ↓ ERO, Lipoperoxydation, Bax et casp-3 ↓ Bax/ Bcl-2 | Ghaznavi, 2015 |
| | H ₂ O ₂ 5mM Aβ 1-40 5 µM | 100µg/mL | Glucose | 4nm | - | ↓ Agrégats Aβ, ERO Biocompatibilité | Li, 2013 |

| | | | | | | | |
|-------------------------------------|--|---|----------------------------|------------|--|--|-------------------------|
| Macrophages | Glutamate 5mM | 2ng/mL à 200µg/mL | - | 6- 12nm | - | Neuroprotecteur ↓ ERO (50%) ↑ survie ∅ toxicité | Schu bert, 2006 |
| | LPS 1µg/mL IFN 100U/mL | 1nM à 30µM (172pg/mL à 5,2 µg/mL) * | - | 3-5nm | Intracellulai re (Phago- some et Cyto- plasme) | Effet anti-inflammatoire ∅ toxicité ↓ ERO, iNOS, NO, dommage ADN | Hirst, 2009, 2010 |
| | LPS 2µg/mL | 1ng – 1mg/mL | - Sigma | 53nm | Intra- cellulaire Macro- phages et cellules Kupffer | Atténuation de la septicémie induite par le LPS ↓ ERO, iNOS, Apoptose, Casp3, Bax/ Bcl2 Restaure TNFα, IL6, IL1β, HMGB1, NO, iNOS, COX-2 ↓ MAPK et NF-kB | Selva raj 2015 |
| Cellules de moelle osseuse | H ₂ O ₂ – 100nM | 10nM (1,7ng/ mL)* | - Sigma | 2-5nm | - | Neuroprotection ↑ survie ↓ mortalité ↑ nombre de neurones Autorégénération | Das, 2013 |
| Fibro- blaste | H ₂ O ₂ – 0,5 à 2mM | 1,5 à 10µM (258ng/mL à 1,7 µg/mL) * | OA, PEI, PAAOA, PMAO | 4 – 8nm | - | Propriétés antioxydantes sont fonction du recouvrement et diamètre + réactive = + petite et revêtement + fin NPC préserve ± leur capacité antioxydant avec le revêtement ↓ ERO | Lee, 2013 |
| Progénit eurs cardiaqu es | H ₂ O ₂ 50µg/mL | 10, 25 et 50µg/mL | PLGA | 5-8nm | Cytoplasme | Protection stress oxydant ↓ ERO ∅ modification morphologie/ structure cellulaire | Pagliar, 2012 |
| Neuro- blastome | Plaqué Aβ | 200mM (34mg/mL) * | PEG | 3-5nm | Ciblage plaques Aβ | Protection contre toxicité induite par peptides Aβ ↑ Viabilité ↓ Apoptose et neurites (nombre et taille) ↑ TrkB, ERK5 et ↓ BDNF, P75, ERK 1 et 2 | Cimini, 2012 |
| Cellules endo- théliales | H ₂ O ₂ - 0,2 à 1mM 30min | 5 à 40µg/mL | - | 20nm | Intra- cellulaire Endocytose médiée par cavéoles et clathrine | Protection contre l'apoptose induite par le stress ox ∅ Toxicité ↑ viabilité ↓ Apoptose, ERO ↑ MMP | Chen, 2013 |
| Neurones | NO (SNOC) (100µM) AB ₂₅₋₃₅ (10µM) 3-NP (10mM) Glutamate (150µM) NMDA (150µM) | 100nM (17,2ng/m L)* | - | 3-8nm | Mito- chondrie | ↓ ERN, 3NT, mort cellulaire, hyperphosphorylation de S616 de DRP1 induite par NO ↓ fragmentation mitochondrial, induite par Aβ ↓ mort cellulaire induite par NMDA, Aβ, Glutamate et 3-NP | Dow ding, 2014 |

| | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|---|-----|------------------------------|----------------------------------|---|------------|
| | H ₂ O ₂ – 50µM | 25nM (4,3ng/mL) * | - | 7-10nm 125nm (DLS) | - | ↓ apoptose et stabilisation du potentiel mitochondrial ↓ Nécrose, ERO, Flux calcique, Cyt c, Caspase 3 et 9, ratio NADH/ NAD+ ↑ viabilité, ATP, potentiel membranaire mitochondrial | Arya, 2014 |
| Cellules issus d'ovaires de Hamster | tBHP 1mM | 0,125 à 2,5mM 21,5µg/mL à 430µg/mL | PEG | 3nm 17nm | Internalisation Intra-cellulaire | Activité SOD et CAT – like Protection contre le TBHP ↑ internalisation Concentration et Temps dépendant Toxicité à partir de 0,25mM | Kim, 2012 |

Abréviation : Gy : Gray ; tBHP : tert-butyl hydroperoxide ; PSPM : 3-sulfopropylmethacrylate ; PMETAC : 2-(methacryloyloxy)ethyl-trimethylammoniumchloride) ; Aβ XX-XX : Peptide β-Amyloïde et longueur du peptide ; TrkB : Tropomyosin receptor kinase B ; ERK : Extracellular-signal-regulated kinase 5 ; BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor ; P75 :Neutrophine P75 receptor ; HMGB1 : high-mobility group box 1 ; OA : Acide oléique ; PEI : polyethyleneimine, PAAOA : poly(acrylic acid)-octylamine, PMAO : olymaleicanhydride-alt-1-octadecene ; PLGA : poly(lactic-co-glycolic acid) ; SNOC : S-nitrosocysteine ; 3-NP : 3-nitropropionic acid ; * Concentration massique non fournie et calculée à partir de la concentration molaires.

L'ensemble de ces données met en évidence l'intérêt des NPC, dans de nombreux modèles de pathologies liées au stress oxydant et a conduit à leur évaluation dans des modèles *in vivo*.

5.4.1) Evaluation de l'activité antioxydante des NPC *in vivo*

De nombreuses études ont confirmé les effets antioxydants des NPC dans différents modèles de pathologies *in vivo* (Tableau VIII). De plus, l'absence de toxicité de ces particules souligne leur biocompatibilité. Quelques revues ont décrit le potentiel protecteur des NPC notamment dans les pathologies cancéreuses (Gao et al., 2014) et neurologiques/ neurodégénératives (Estevez et al., 2011; Naz et al., 2017).

Tableau VIII : Étude démontrant un effet antioxydant *in vivo* des NPC.

| Modèle | Induction & Animaux | [NPC] et Injection | Coating NPC | Taille NPC | Injection & Localisation | Résultats | Ref |
|------------------------------------|--------------------------------------|--|---------------|------------|--|---|-------------------|
| Cardiomyopathie | MCP-1 transgénique Souris (FVB/N) | 15nmol (0,15mg/kg) * IV | Nanoactive™ | 7nm | - | ↓ Infiltration leucocytes, 3-NT, NOx, Apoptose, TNFα, IL-1B, IL6, Grp78, PDI, HSP, MCP-1 et CRP plasmatique | Niu, 2007 |
| Pathologies rétinienne | KO Vldr Souris à P7 (C57Bl/6) | 172ng (40µg/kg)*, ** IV | - | 3-5 nm | - | ↓ pathologie (lésion vasculaire intrarétinale) ↑ néovascularisation ↓ ERO, 3-NT, 8-OHdG, p47-phox ↓ VEGF | Zhou, 2011 |
| | - Rat (Sprague) | 1µM à 1mM (1,72ng à 1,72µg/kg) *, *** IV | - | 3-5 nm | Rétine | Non toxique à 9 jours et 4 mois (structure morphologique, fonction) | Wong, 2013 |
| Encéphalomyélite auto-immune (EAE) | MOG 35-55 Souris (C57Bl/6) | 10 à 30mg/kg IV | EDTA/Citrate | 2,9nm | Foie > Rate > Rein > Cerveau + Moelle > Cervelet Intracellulaire Mitochondrie Dendrites ½ vie : 4h | Protection des ERO induit par une maladie auto-immune ↓ Sévérité, déficit moteur, score clinique ↓ ERO (31%) notamment cellules de Purkinje | Heckman, 2013 |
| | MOG 35-55 Souris (C57Bl/6) | 1mg/kg | Dextran / PEG | 3-5nm | - | Amélioration des symptômes ↓ score clinique, ERO ↓ GFAP, Iba1, TNFα, IL-17, IFNγ et ↑ MBP | Eitan, 2015 |
| Toxicité Hépatique | CCI4 Souris (C57Bl/6 et CD-1) | 0,5mg/kg | - | 3-5nm | Rate > Foie > Poumon > Rein > Coeur > Cerveau Lysosome | Effet antioxydant et biodistribution Absence de toxicité (15j – Histologie) ↓ lipoperoxydation et dommage ADN ↑ Leucocyte | Hirst, 2009, 2010 |
| Intoxication | Plomb 25mg/kg Rat (Wistar) | 1000mg/kg | - | - | - | Protecteur contre le stress oxydant induit par le Pb : ↑ ERO, TBARS, SOD, CAT, Bax, Casp3 et ↓ Bcl2 et thiols totaux Retour aux valeurs physiologiques par les NPC | Hosseini, 2015 |
| Infection (Septicémie) | LPS 40mg/kg Rat (Sprague) | 0,5mg/kg | - Sigma | 53nm | Foie (cellules Kuppfer) | Rétablissement des marqueurs physiques, et comportementaux Restaure TNFα, IL1α et β, MIP-3B, MCP-1 et 3, numération sanguine ↓ MAPK et NF-κB | Selvaraj, 2015 |

Abréviation : **MCP-1** : monocyte chemoattractant protein 1 ; **Grp78** : glucose-regulated protein 78 ; **PDI** : protein disulfide isomerase ; **HSP** : Heat shock protein **CRP** : C-reactive protein ; **Vldr** : very low density lipoprotein receptor ; **p47 Phox** : phosphorylation de la p47 pour l'activation de la NAPDPH oxidase ; **MOG 35-55** : Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein ; **MBP** : Myelin basic protein ; **CCI4** : carbon tetrachloride ; **Pb** : Plomb ; **TBARS** : Thiobarbituric acid reactive substances ; **MIP-3B** : macrophage inflammatory protein-3 beta ; * Données non fournies et calculées à partir des données de l'article (quantité ou concentration molaire et poids moyen des animaux), ** données calculées pour une souris à P7 (\approx 4g), l'injection étant réalisé en intraoculaire, la concentration y sera nettement supérieure et difficilement extrapolable. *** données calculées pour un rat de 200g, injection également réalisée en intraoculaire, la concentration y sera nettement supérieur et difficilement extrapolable.

L'ensemble de ces données met en évidence le potentiel antioxydant et protecteur des NPC dans des pathologies liées au stress oxydant sur des modèles *in vivo*. Cependant peu d'études ont été réalisées dans des modèles d'ischémie cérébrale. Une revue publiée en 2016 discute du potentiel protecteur des NPC pour traiter l'ischémie cérébrale en citant des applications dont les pathologies de la rétine, les maladies neurodégénératives, les cardiomyopathies, le cancer, l'inflammation chronique et l'ischémie cérébrale (Zhou et al., 2016).

5.4.2) Utilisation des NPC antioxydantes dans l'ischémie cérébrale

Plusieurs études ont évalué l'activité antioxydante des NPC dans des modèles d'ischémie cérébrale *in vitro* et *in vivo*.

La première étude sur l'utilisation des NPC dans un modèle d'ischémie cérébrale a été publiée en 2011 sur des tranches d'hippocampe placées dans un milieu hypoxique (Estevez et al., 2011). Les NPC utilisées (caractéristiques décrites dans le tableau IX) diminuaient la mortalité cellulaire, la concentration d'ERO et la formation de 3-Nitrotyrosine, marqueur de la production d'ERN. Les NPC ont été localisées au niveau mitochondrial, et le niveau de perturbation de la mitochondrie observé par TEM était diminué grâce aux NPC.

La première étude *in vivo* suggérant l'efficacité des NPC PEGylées pour le traitement des AVC est parue en 2012 (Kim et al., 2012). Les NPC ont été injectées dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat (MCAO ; 60 min) induisant une diminution du volume de lésion de 50% pour une dose de NPC allant de 0,5 à 0,7 mg/kg. Elles ont également induit une diminution de l'apoptose, des ERO, de la peroxydation lipidique, des protéines pro-apoptotiques dont p53-phosphorylé, caspase 3 et gelsolin. Après administration, les NPC ont été détectées dans le cerveau, le foie, les reins et le cœur.

Une étude publiée en 2016 révèle que les NPC augmentent la neurogènes sur un modèle de culture primaire d'hippocampe et diminuent les déficits mnésiques (tests comportementaux) après induction

d'une hypoxie hypobarique sur le rat (Arya et al., 2016). Les NPC PEGylées ont la capacité de passer la BHE, mais seulement 0,1% de la dose injectée a été retrouvé dans les neurones hippocampiques. Un effet antioxydant des NPC a été montré dans l'hippocampe des rats ayant subi une hypoxie, dont une diminution des ERO, de la lipo-péroxydation, de l'oxydation de l'ADN et de la carbonylation des protéines. Le déficit mnésique induit par l'hypoxie était partiellement rétabli par l'injection des NPC. Les NPC ont diminué l'apoptose induite par l'hypoxie mais également augmenté la neurogénèse. Enfin, une augmentation de l'expression de l'AMPK (adenine monophosphate-activated protein kinase) médié par la PKC (protein kinase C) et activant CBP (cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein) impliquées dans la neurogénèse a été observé mais également une diminution des Caspases 3 et 8 impliqué dans l'apoptose.

Tableau IX : Études montrant un effet antioxydant des NPC dans des modèles d'ischémie cérébrale.

| Modèle | Induction | [NPC] | Coating NPC | Taille NPC | Localisation | Résultats | Ref |
|--|---|----------------|-------------|--------------------------|--|---|--------------|
| Tranche d'hippocampe | Hypo-glycémie, Hypoxie, pH acide 30min | 0,1 à 2µg/mL | - | 10nm | Mitochondrie | Neuroprotection ↓O ₂ et NO (15%) ↓3-NT - ONOO- (70%) ↓ perturbation mitochondriale | Estevez 2011 |
| Rat Sprague-Dawley | Ischémie cérébrale MCAO 1h | 0,1 à 1,5mg/kg | PEG | 3nm 17nm | Site ipsilatérale > controlatérale Foie, Rein | Effet protecteur ↓ Volume infarctus (50%) ↓ Apoptose (75%) ↓ ERO (50%), Peroxydation lipidique (30%) et protéine pro-apoptotique (500%) | Kim, 2012 |
| Culture primaire hippocampe Rat | Hypoxie hypobarique | 5µg/kg | PEG | 3nm 40-45nm (DLS) | Intracellulaire neurones hippocampe (0.1%) | Promeut neurogénèse et diminue défaut de mémoire NPC passe la BHE (0,1%) ↓ ERO, MDA, lésion ADN, carbonylation protéique induit par l'hypoxie ↓ perte de mémoire et ↑ densité neuronale ↓ apoptose Régulation AMPK - PKC - CBP pour neurogénèse et ↓ Casp-3 et 9 | Arya, 2016 |

Abréviation : PEG : Polyéthylène glycol ; tBHP : tert-butyl hydroperoxide ; AMPK : adenine monophosphate-activated protein kinase ; PKC : protein kinase C ; CBP : cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein ; MCAO : occlusion de l'artère cérébrale moyenne

Ainsi, l'ensemble de ces données souligne le potentiel protecteur des NPC pour l'ischémie cérébrale. Cependant les taux de NPC sur le site de l'infarctus restent faible et aucune étude n'a utilisé de NPC ciblant afin d'augmenter l'adressage aux zones lésées lorsque notre projet a débuté. Ainsi notre projet s'est porté sur le développement de NPC innovantes pouvant cibler les zones lésées suite à une ischémie cérébrale.

BUT DU TRAVAIL

BUT DU TRAVAIL

Actuellement, seules des stratégies de recanalisation (pharmacologique ou mécanique) ont été approuvées pour le traitement des AVC ischémiques, mais aucune stratégie protectrice n'est en revanche disponible aujourd'hui. En particulier, bien que le rôle délétère du stress oxydant dans les lésions post-ischémiques soit clairement établi, aucune stratégie antioxydante n'a démontré d'efficacité clinique à ce jour. Or, les nanoparticules d'oxyde de cérium semblent démontrer des propriétés antioxydantes intéressantes de par leur capacité à capter les radicaux libres, à mimer l'activité des enzymes antioxydantes et à s'autorégénérer. L'objectif de ce travail de thèse est de développer des NPC originales, tant par leurs polymères de recouvrement que par leur capacité à cibler l'endothélium, et de démontrer leur intérêt pour le traitement des AVC ischémiques et la prévention des transformations hémorragiques qui les accompagnent. Ce projet s'articule autour de 4 grands axes :

- le **premier axe** concerne l'impact des copolymères, synthétisés par Specific Polymers pour recouvrir les NPC, sur la **toxicité** et la **biodistribution** de ces nanoparticules. La toxicité des NPC a été évaluée *in vitro* sur des cellules endothéliales cérébrales de la lignée bEnd.3 par les mesures de l'activité métabolique et de la mortalité cellulaire, et *in vivo*, par des études anatomopathologiques, des dosages plasmatiques des enzymes hépatiques et une numération formule sanguine réalisées chez la souris. Pour les études de biodistribution, des techniques directes telles que l'ICP-OES et la microscopie électronique à transmission ont permis de vérifier l'internalisation et la localisation subcellulaire des NPC. Ces études ont été complétées par des méthodes indirectes utilisant des NPC fonctionnalisées par un fluorophore, la cyanine 5, greffé directement sur les copolymères des NPC. La cyanine a ensuite été détectée soit par microscopie confocale et cytométrie en flux pour les études *in vitro*, soit imagerie optique ou dosage dans les organes pour les études *in vivo*.
- le **deuxième axe** s'intéresse à l'influence du recouvrement des NPC sur leur **capacité antioxydante**. L'effet antioxydant des NPC a été testé *in vitro* sur les cellules bEnd.3, tout d'abord en condition « physiologique », puis dans un modèle de stress oxydant induit par le glutamate. Nous avons notamment recherché l'effet des NPC sur la production des radicaux libres, la consommation des antioxydants endogènes et les lésions cellulaires, en particulier au niveau des acides nucléiques.

- le **troisième axe** concerne le **ciblage de l'endothélium** par les NPC. Le peptide ciblant VCAM-1 a été greffé sur les copolymères recouvrant les NPC par l'intermédiaire d'un agent pontant, le réactif de Traut. Des études ont ensuite été réalisées pour déterminer le rendement de cette réaction. Enfin des expériences ont été réalisées afin de confirmer le ciblage de l'endothélium par ces NPC.
- Enfin, dans le **quatrième axe**, le **potentiel thérapeutique** des NPC a été évalué dans un modèle murin d'**ischémie cérébrale**.

MATÉRIELS ET
MÉTHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1) Préparation des nanoparticules

1.1) Matériels

La suspension aqueuse de nanoparticules d'oxyde de cérium (NPC) de 8nm de diamètre (200g/L, pH=1.5) a été synthétisée par Rhodia (Centre de Recherche d'Aubervilliers, France). Les polymères utilisés pour recouvrir les NPC sont synthétisés et fournis par Specific Polymers (Castries, France) sous forme de poudre.

1.2 Greffage des recouvrements

Les nanoparticules nues s'agrègent lorsque le pH est supérieur à 2 ; un recouvrement est donc greffé sur les NPC afin de limiter leurs interactions et agrégation à pH physiologique et d'améliorer leur biocompatibilité. Différents recouvrements ont été utilisés, à base de PEG (Polyéthylène Glycol) de différentes tailles ; certains portent en outre des fonctions amines en bout de chaîne. Les PEG sont greffés sur une chaîne d'acide polyméthacrylique portant des fonctions phosphonates, ces dernières ayant une forte affinité pour les NPC. La nomenclature utilisée pour les différents PEG est « ICONS XX », ICONS correspondant au nom du projet et XX représentant le numéro de synthèse par Specific Polymers. Trois recouvrements avec différents PEG ont été utilisés (Figure 26) :

- ICONS 30 : PEG de 2 kDa
- ICONS 36 : PEG de 2 kDa + PEG – NH₂ de 1 kDa
- ICONS 73 : PEG de 2kDa + PEG – NH₂ de 2 kDa

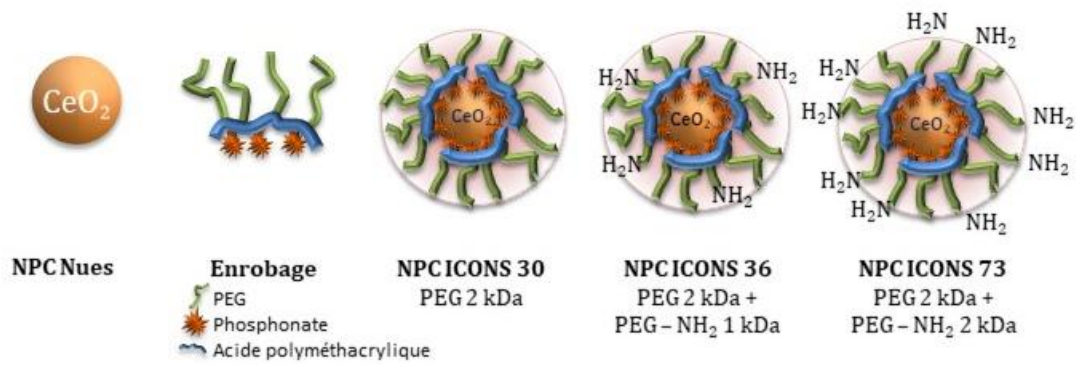


Figure 26 : Représentation schématique des particules nues, du recouvrement et des différentes NPC.

De gauche à droite : NPC nues, recouvrement, NPC ICONS 30 (PEG non aminés), ICONS 36 (PEG aminés de 1kDa et non aminés de 2 kDa) et ICONS 73 (PEG aminés de 2kDa et non aminés de 2 kDa).

Les suspensions de NPC et de polymères sont diluées à 0,1% (1mg/mL) dans l'eau milliQ ; la suspension de polymères est ajustée à pH 1,4 pour éviter l'agrégation ultérieure des NPC. Les deux suspensions sont ensuite mélangées selon un ratio X=0,2 (soit 5 g de polymères pour 1 g de nanoparticules) : les NPC sont ajoutées goutte à goutte sous agitation dans la suspension de polymères. Un volume de 1mL est prélevé pour vérifier la taille des NPC par DLS (Matériel et Méthodes 3.3. et Résultats 1.3) ; le pH est ensuite ajusté à 8,5 et l'analyse par DLS renouvelée. L'absence d'augmentation de la taille des NPC lors du passage du pH 1,5 au pH 8,5 témoigne d'un greffage efficace des polymères sur les NPC puisqu'il prévient leur agrégation.

Les suspensions de NPC sont ensuite concentrées pour obtenir une concentration finale de 2% (20mg/mL). Pour cela, les suspensions sont passées sur des colonnes d'exclusions de 30kDa (VS 0622, Vivaspin 6, Sartorius, Göttingen, Allemagne) permettant de retenir les NPC (200-300kDa). Après centrifugation des colonnes (3 000g, 12 minutes), les NPC sont reprises dans l'eau miliQ pour obtenir une suspension à 2%. Les NPC de ces suspensions concentrées sont ensuite caractérisées.

1.3) Caractérisation des NPC

1.3.1) Concentration en cérium des suspensions de NPC.

Les nanoparticules d'oxyde de cérium absorbent fortement la lumière dans les ultra-violet (< 400nm). L'absorbance des suspensions aqueuses de NPC (diluées au 1/100^{ème}) est donc mesurée à l'aide d'un spectromètre UV-Visible (SmartSpecPlus, BioRad®, Marnes-la-Coquette, France). La

concentration en cérium des suspensions de NPC est ensuite calculée grâce à la loi de Beer-Lambert :

$A = \epsilon \times l \times C$ avec :

- A : absorbance ($A = I_0 / I$ avec (I_0) intensité incidente et (I) intensité transmise).
- ϵ : coefficient d'extinction massique propre à chaque suspension et longueur d'onde (en $L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$).
- l : trajet optique (en cm).
- C : concentration en NPC (en $g \cdot L^{-1}$).

La concentration massique peut ainsi être déterminée selon la formule : $C = A / (l \times \epsilon)$.

1.3.2) Potentiel zêta des NPC

Le potentiel zêta représente la charge électrique (exprimée en mV) qu'une particule acquiert en solution grâce aux ions qui l'entourent. Le potentiel zêta des différentes suspensions aqueuses de nanoparticules d'oxyde de cérium a été mesuré par nos partenaires à l'Université Paris Diderot à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Royaume-Uni).

1.3.3) Taille des NPC

Deux méthodes ont été mises en œuvre pour mesurer la taille des NPC : la microscopie électronique, pour mesurer les NPC nues (« le cœur » de cérium), et la diffusion dynamique de la lumière (DLS), pour mesurer le diamètre hydrodynamique des NPC recouvertes par les polymères (Nobbman, UL, 2014 ; Bera B, 2015 Micro).

En ce qui concerne la microscopie électronique, les suspensions de NPC à 2% (20mg/mL) et pH=2 ont été déposées sur des grilles de cuivre à mailles de carbone ultra-fines de 400 mesh (Mesh : Unité de granulométrie pour mesurer la taille d'un tamis ; 400 mesh : $37\mu m$; Ted Pella, Inc) et l'acquisition des images a été réalisée grâce à un appareil Tecnai 12, microscope électronique à transmission fonctionnant à 80kV et équipé d'une caméra Keen View 1K x 1K (Tecnai, FEI company, Hillsboro, Oregon, États-Unis). Sur ces micrographes, 200 NPC ont ensuite été analysées grâce au logiciel Image J pour déterminer la taille moyenne des NPC.

Pour la DLS, les suspensions de NPC ont été diluées à 0,01% dans du PBS et les mesures effectuées directement après les recouvrements à pH=2, puis après ajustement à pH physiologique (pH=8) par

de la soude (NaOH), ainsi que dans du milieu de culture DMEM (31966-021, Gibco, Thermofisher Scientific, Illkirch, France) en prévision des futures études *in vitro*. La taille des NPC dans les suspensions est mesurée avec le Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Royaume-Uni), comme pour le potentiel Zeta. Les résultats sont obtenus sous la forme d'une courbe de type gaussienne représentant la distribution des NPC en fonction de leur taille. L'appareil détermine également l'indice de polydispersité (IP), utilisé pour décrire la dispersion et le degré de non-uniformité d'une distribution de tailles des particules (Nobbman et al., 2014 ; Bera et al., 2015 Micro).

1.3.4) Dosage des fonctions amines

Comme décrit précédemment, certains PEG portent des fonctions amines en bout de chaîne, dans l'optique de fonctionnaliser les NPC, notamment en greffant un fluorophore ou un peptide ciblant. Nous avons quantifié le taux d'amines des NPC afin de déterminer la quantité correspondante de fluorophore ou de peptide à ajouter. Le dosage des fonctions amines a été réalisé grâce à la fluorescamine, molécule qui devient fluorescente après réaction avec les amines primaires. La glycine (3908.2, Roth, Lauterbourg, France) qui possède une seule fonction amine primaire a été utilisée pour réaliser une gamme étalon de 1 μ M à 1mM. La gamme et les échantillons sont déposés en duplicata à raison de 100 μ L par puits dans une plaque 96 puits. Une solution de fluorescamine (43749.ME, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) est préparée à 3mg/mL dans l'acétone (9372.1, Roth, Lauterbourg, France), 50 μ L de réactif sont ajoutés par puits. La lecture est réalisée au fluorimètre (Infinite F200 PRO, TECAN, Lyon, France) à une longueur d'onde d'excitation de 400nm et d'émission de 460nm.

1.4) Fonctionnalisation des NPC

1.4.1) Greffage de la cyanine

Afin de détecter les NPC par fluorescence, la sulfo-cyanine5-NHS-ester (ou Cyanine 5 ; 23320, Lumiprobe, Hanovre, Allemagne) est greffée directement sur les fonctions amines des nanoparticules (Figure 27).

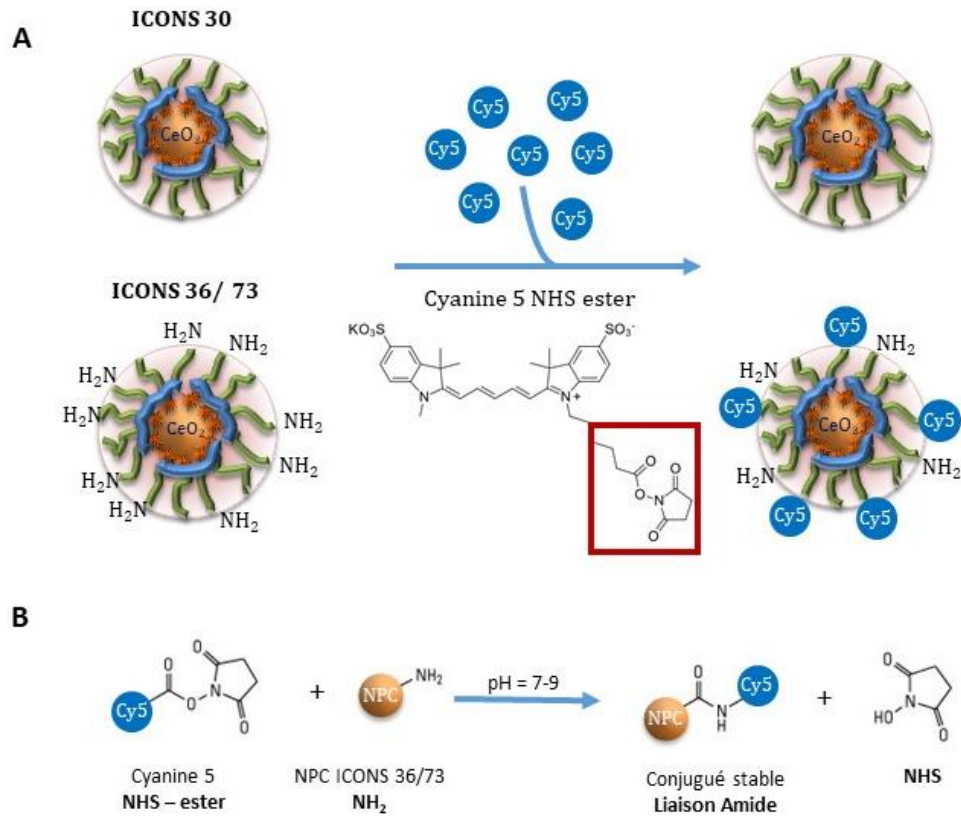


Figure 27 : Schéma (A) et réaction (B) du greffage de la cyanine-5 sur les NPC.

(A) A gauche, deux NPC sont représentées : les NPC ICONS 30 non aminées et les NPC ICONS 36 ou 73 aminées. Au centre, la cyanine 5 NHS ester (Cy5) et sa formule chimique dont la partie NHS ester encadrée en rouge. A droite, les NPC ICONS 30 sans cyanine 5 et les NPC ICONS 36/ 73 sur lesquelles la cyanine est greffée sur les fonctions amines. (B) Réaction du greffage de la cyanine 5 NHS – ester sur l'amine primaire des NPC formant une liaison amide entre les NPC et la cyanine 5.

La quantité de cyanine 5 NHS-ester est ajustée en fonction du taux d'amines par NPC précédemment déterminé. Le pH du milieu réactionnel (NPC et PBS) est ajusté à 8-9 pour permettre le greffage de la cyanine 5 (q.s.p. 1mL). Les NPC ICONS 36 ou ICONS 73 et la cyanine 5 sont incubées 2 heures à température ambiante sous agitation rotative. Cinq lavages sont ensuite réalisés avec 6mL de PBS dans une colonne d'exclusion de 30kDa (VS 0622, Vivaspin 6, Sartorius, Göttingen, Allemagne) sous centrifugation à 4500g pendant 15 minutes pour éliminer l'excès de cyanine 5 non fixée (Figure 28).

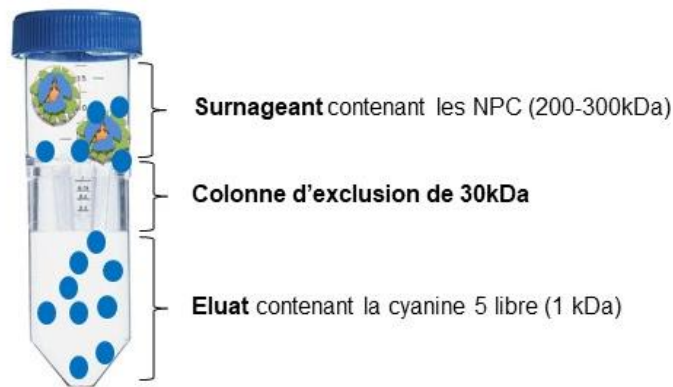


Figure 28 : Schéma de la colonne d'exclusion de 30kDa permettant la séparation entre les NPC et la cyanine 5 libre. La partie centrale est constituée par la colonne d'exclusion, la partie supérieure (« surnageant ») contient les NPC (200 à 300kDa) ; la cyanine 5 libre (1kDa) traverse la colonne d'exclusion et se retrouve dans « l'éluat ».

La fluorescence est mesurée après chaque lavage dans les surnageants et dans les éluats à une longueur d'onde d'excitation de 604nm et un spectre d'émission de 620 à 800nm (Varian Cary Eclipse, Agilent Technologies, Santa Clara, États-Unis). Une gamme étalon de cyanine 5 (Figure 29) de 50 à 10 000ng/mL permet de déterminer la quantité de cyanine 5 présente dans les surnageants (et donc fixée aux NPC) et dans les éluats (afin de s'assurer de l'élimination de toute la cyanine 5 libre à l'issue des lavages).

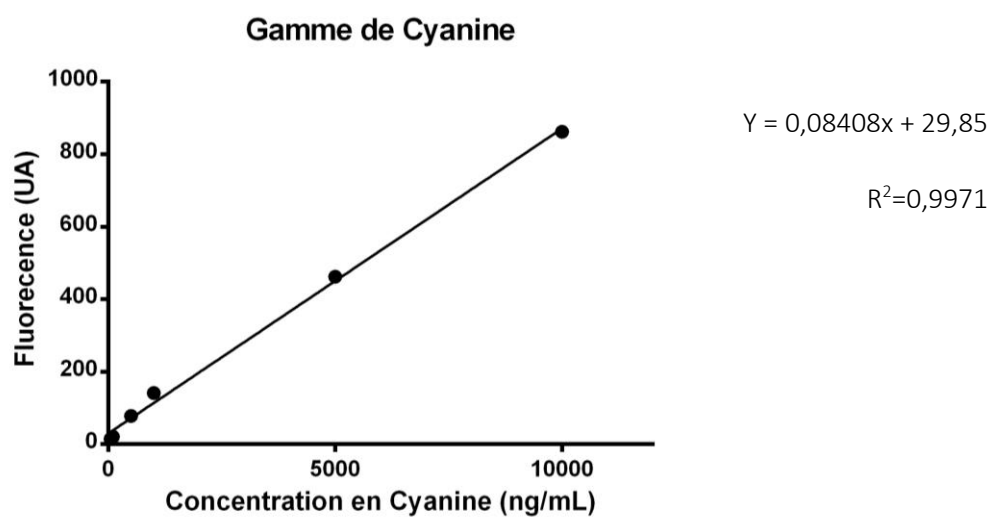


Figure 29 : Gamme étalon de cyanine 5.

Les NPC ICONS 30 ont été traitées comme les NPC ICONS 36 et 73 et utilisées comme contrôle afin de confirmer que les lavages aient éliminé toute la cyanine 5 libre du surnageant.

Le rendement du greffage de la cyanine 5 (exprimé en %) est calculé selon la formule suivante :
Quantité finale dans le surnageant / Quantité Initiale x 100.

1.4.2) Greffage de peptides

Un peptide ciblant l'endothélium vasculaire et son peptide « scramble » ont été synthétisés par GenePep (Saint Jean de Védas, France). Le peptide ciblant a été synthétisé à partir d'une étude démontrant la spécificité de cette héptapeptide à se fixer sur VCAM-1 *in vitro* et *in vivo*. VCAM-1 est une protéine exprimée sur les cellules endothéliales (Burtea C, 2009 J Med Chem). Les deux peptides contiennent les mêmes acides aminés mais leur séquence (ordre) est différente : CNNSKSHTC pour le peptide et HSCNKNSCT pour le peptide scramble comme présenté dans la figure 30.

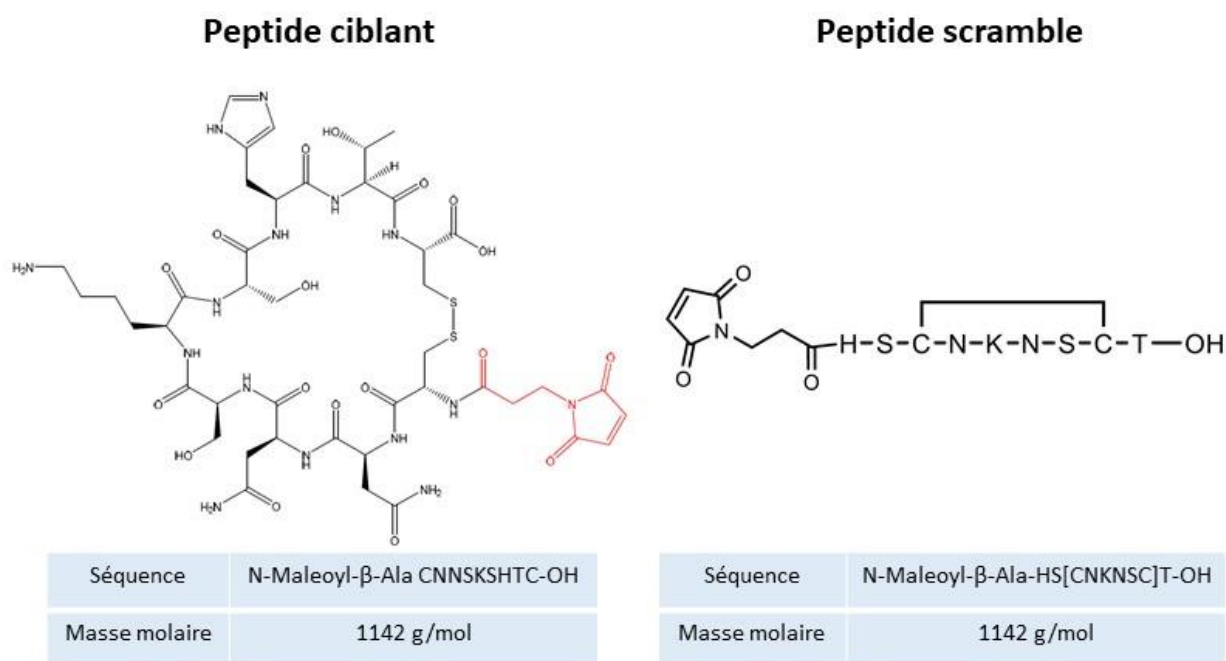


Figure 30 : Séquence du peptide ciblant et du peptide scramble.

Contrairement à la cyanine 5, ces peptides ne peuvent se greffer directement sur les fonctions amines des NPC ; en revanche, ils peuvent se fixer sur des fonctions thiols. Le réactif de Traut (2-iminothiolane hydrochloride) a donc été utilisé comme agent pontant : en se fixant sur les fonctions amines des NPC, ce réactif s'ouvre pour libérer une fonction thiol qui peut ensuite lier les peptides (Figure 31).

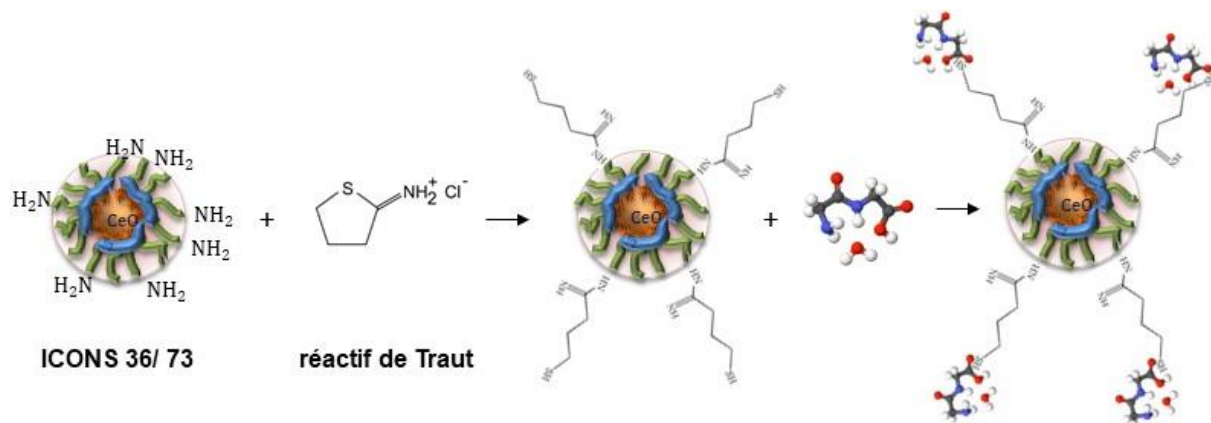


Figure 31 : Schéma du greffage du peptide sur les NPC.

Le réactif de Traut se greffe sur les fonctions amines des NPC ICONS 36 et 73 en libérant une fonction thiol. Le peptide ciblant (ou scramble) peut ensuite se fixer sur cette fonction thiol.

Le réactif de Traut (Sigma, I6256) à 10 équivalents d'amine (ratio 10 : 1, 10 fois plus de réactif de Traut que de fonction amine) est ajouté goutte à goutte sur les NPC sous agitation au vortex, puis l'ensemble est incubé 30 minutes à température ambiante sur un agitateur rotatif. L'excès de réactif est éliminé par passage sur colonne d'exclusion de 30kDa (VS 0622, Vivaspin 6). Le peptide est alors ajouté goutte à goutte aux NPC, sous agitation au vortex, puis la suspension est déposée sur un agitateur rotatif 1h à température ambiante. Cinq lavages sont réalisés par du PBS dans une colonne d'exclusion de 30kDa sous centrifugation à 4500g pendant 15 minutes afin d'éliminer l'excès de peptide non fixé aux NPC.

Afin de déterminer le rendement du greffage des peptides, les éluats sont récupérés et concentrés 10 fois (Automatic SpeedVac AS160 ; Savant Instruments Inc ; Farmingdale, NY, États-Unis) afin de doser les quantités de peptides non fixés sur les NPC. Le dosage des peptides est réalisé à l'aide de la fluorescamine comme pour le dosage des fonctions amines décrit ci-dessus. Une gamme étalon de

peptide ciblant et de son peptide scramble est réalisée de 0 μ M à 440 μ M. La gamme et les échantillons sont déposés en duplicata dans une plaque 96 puits à raison de 100 μ L par puits. Une solution de fluorescamine à 3mg/mL dans l'acétone (Roth 9372.1) est préparée et 50 μ L de cette solution sont ajoutés par puits. La lecture est réalisée au fluorimètre TECAN (Infinite F200 PRO) à une longueur d'onde d'excitation de 400nm et d'émission de 460nm. La quantité de peptides présents dans les éluats est alors déterminée grâce aux courbes étalons (Figure 32).

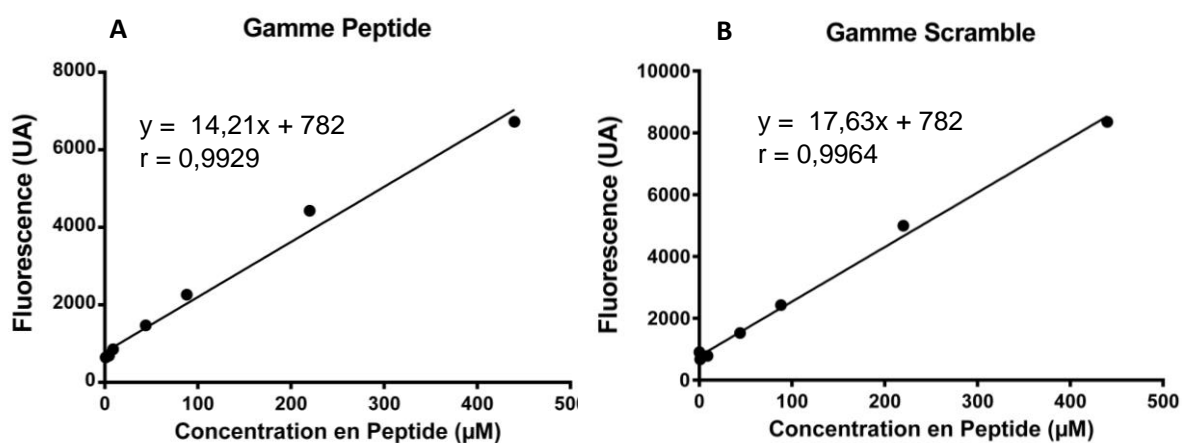


Figure 32 : Gammes étalon de peptide ciblant (A) et de peptide scramble (B) dosés par la fluorescamine.

Connaissant la quantité totale de peptide récupérée dans les éluats et la quantité initiale ajoutée aux NPC, le rendement de greffage des peptides peut être calculé ainsi : $((\text{Quantité Initiale} - \text{Quantité totale dans les éluats}) / \text{Quantité Initiale}) \times 100$.

2) Études *in vitro*

2.1) Culture cellulaire

Les cellules cérébrales endothéliales immortalisées de la lignée bEnd.3 (ATCC® CRL-2299™, Manassas, Virginia, USA) ont été achetées chez Sigma (96091929, Sigma-Aldrich). Ces cellules ont été choisies car les NPC ICONS sont destinées à cibler l'endothélium vasculaire cérébral, afin d'y concentrer leurs effets antioxydants et de protéger les vaisseaux cérébraux de l'ischémie.

2.1.1) Expansion des cellules

Dès réception de l'ampoule contenant les cellules (2 millions à passage 20), elles sont mises en culture dans des flasques T75 (Sarstedt, 83.3911.002) afin d'être amplifiées. Après quelques jours de culture, les cellules arrivant à confluence sont repiquées. Sur les 10 millions de cellules récupérées au passage 21, 7 millions sont congelés à raison de 1 million de cellules par cryotube dans 900µL de DMEM Glutamax (31966-021, Gibco, Thermofisher Scientific, Illkirch France) et 100µL de DMSO (10%), agent cryo-conservateur (23.488.294, Prolabo, Fontenay-sous-bois, France). Tous ces aliquots sont conservés à -80°C hormis deux aliquots au passage 21 maintenus à -176°C dans de l'azote liquide pour une conservation plus durable. Les 3 millions de cellules restants sontensemencés dans 3 flasques T75. Une fois ces 3 flasques à confluence, 30 millions de cellules sont récupérés dont 27 millions sont congelés (27 cryotubes) et 3 millions réensemencés, cette opération étant répétée jusqu'au passage 25. Cette technique d'expansion permet d'obtenir un stock d'aliquots à passage précoce (7 aliquots P21 et 27 aliquots de P22 à P25), conservé à -80°C et décongelé dès que les cellules en cours d'utilisation dépassent le 30^{ème} passage.

2.1.2) Cultures des cellules

Les tubes, pipettes et autres consommables en plastique sont commandés chez Sarstedt (Nümnrecht, Allemagne). Les plaques de culture cellulaire TPP sont commandées chez Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

Les cellules sont cultivées dans des flasques T75 (Sarstedt, 83.3911.002) dans du milieu DMEM Glutamax (31966-021, Gibco, Thermofisher Scientific, Illkirch France) contenant 10% de sérum de

veau foetal (SVF) décomplémenté (S1810-500, Lot S12450, Dominique Dutscher, Brumath, France) additionné de 1% de pénicilline (100U/mL) et de streptomycine (100µg/mL ; Gibco, 15140122). Elles sont incubées à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. Lorsque les cellules sont à confluence (≈ 90% de la surface de la flasque recouverte, soit environ 10 millions de cellules par flasque T75), elles sont trypsinées (Gibco, 25200056) et repiquées au 1/5ème ou 1/10^{ème} (soit entre 1 et 2 millions) pour conserver la lignée. Les cellules sont utilisées jusqu'au passage 30.

2.2) Étude de la toxicité

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 50 000 cellules par puits (≈ 100 000 cellules/ cm², TPP, 92096) dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont été ensuite traitées par du DMEM (cellules contrôles), du glutamate (100mM), de l'H₂O₂ (2mM) et par les NPC ICONS nues, 30, 36 et 73 (10, 100 et 1000µg/mL). Le glutamate et l'H₂O₂ sont respectivement utilisés pour mimer l'excitotoxicité et comme contrôle positif. Les traitements sont réalisés dans du milieu DMEM sans SVF et sans rouge phénol (Gibco, 21063-09), et l'incubation avec les cellules dure 4h ou 24h. L'activité métabolique a été évaluée par le test au MTT et la mortalité cellulaire par coloration au bleu trypan.

2.2.1) Évaluation de la mortalité cellulaire par le bleu trypan

Le bleu trypan est un colorant d'exclusion utilisé pour colorer sélectivement les cellules mortes : il pénètre dans toutes les cellules, les cellules viables vont pouvoir l'éliminer immédiatement, à l'inverse des cellules mortes qui resteront par conséquent bleues.

Les cellules sont décollées des puits par la trypsine pendant 5 min à 37°C (inactivée par ajout de milieu complet), puis centrifugées à 100g pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite reprises dans 100µL de PBS avec 1% d'albumine de sérum bovin (1000-70, ID Bio, Limoge, France) et coloré par le bleu trypan à 0,2% (Sigma, T8154). Les cellules bleues et blanches sont comptées dans des lames Kova (Dutscher, 050126) avec un minimum de 150 cellules par conditions (\bar{X} = 640). Le pourcentage de mortalité est calculé : [Cellules bleues / (Cellules blanches + bleues)] x 100.

2.2.2) Mesure de l'activité métabolique

La mesure de l'activité métabolique cellulaire est réalisée par le MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl) - 2,5-diphényl-2H-tétrazolium bromide). Le MTT (jaune) est métabolisé en formazan (rose/ violet) par la succinate déshydrogénase mitochondriale (Figure 33). La quantité de formazan ainsi produite est proportionnelle à l'activité métabolique de la cellule.

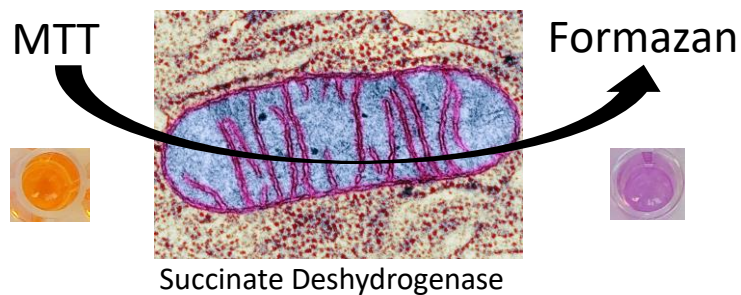


Figure 33 : Principe du MTT.

Le MTT (jaune) est métabolisé en formazan (rose/ violet) par la succinate déshydrogénase mitochondriale. La quantité de formazan produite est proportionnelle à l'activité métabolique de la cellule.

Une solution de MTT (Sigma, S12045) est préparée à 5mg/mL, 10µL sont ajoutés dans chaque puits (concentration finale à 0,5mg/mL) et l'ensemble est incubé pendant 3h. Les puits sont ensuite vidés et le formazan est dissout dans 100µL de DMSO (23.488.294, Prolabo, Fontenay-sous-bois, France) pendant 15 minutes à température ambiante sous agitation. La densité optique est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde spécifique de 570nm et l'absorbance non spécifique à 690nm est retranchée (SpectroStar Nano, BMG Labtech, Champigny sur Marne, France). Les résultats sont exprimés en pourcentage de densité optique de la condition contrôle (cellules bEnd.3 traitées par le milieu DMEM).

2.3) Évaluation de l'effet antioxydant des NPC

L'effet antioxydant des NPC a été évalué par leur impact sur la production d'ERO, sur la consommation en antioxydants endogènes et enfin sur les dommages oxydatifs.

2.3.1) Mesure de la production d'ERO

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 50 000 cellules par puits ($\approx 100\,000$ cellules/ cm^2 , TPP, 92096) dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont été ensuite traitées par du DMEM (cellules contrôles), de la N-acétylcystéine (NAC à 1mM), un antioxydant de référence, du glutamate (100mM) afin de mimer l'excitotoxicité, et par les NPC nues, ICONS 30, 36 et 73 à 10, 100 et 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du milieu DMEM sans SVF et sans rouge phénol (Gibco, 21063-09). Après 4h ou 24h de traitement, la sonde H₂DCF-DA est ajoutée une concentration finale de 20 μM dans chaque puits durant 30 minutes. L'intensité de fluorescence est mesurée au fluorimètre à une longueur d'onde de 535nm ($\lambda_{\text{excitation}} = 485\text{nm}$ / $\lambda_{\text{émission}} = 535\text{nm}$). Pour chaque condition, la production d'ERO est fixée à 100% à T0 ; ou elle est fixée à 100% chez les cellules contrôles.

2.3.1.1) Mesure de la production totale d'ERO

La sonde dichloro-dihydro fluorescéine diacétate ou H₂DCF-DA est une sonde lipophile qui diffuse passivement à travers la membrane cellulaire et qui est clivée par les estérases intracellulaires pour former l'H₂-DCF. L'H₂-DCF réagit ensuite avec les ERO et forme du DCF fluorescent (Figure 34). La quantité de DCF formé est directement proportionnelle à la quantité d'ERO produits par la cellule.

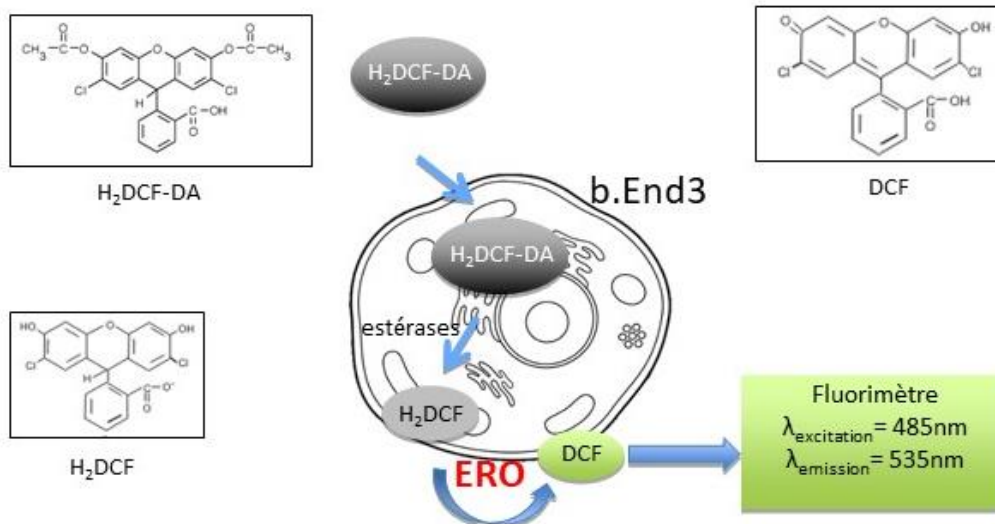


Figure 34 : Principe du dosage des ERO par la sonde H₂DCF-DA.

Les cellules bEnd.3 sont incubées avec la sonde H₂DCF-DA (Sigma D6883) à 20μM durant 30 minutes à 37°C dans l'obscurité. La formation de DCF fluorescent est mesurée au fluorimètre TECAN (Infinite F200 PRO) à une longueur d'onde d'excitation de 485nm et une longueur d'onde d'émission de 535nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'intensité de fluorescence par rapport à la condition contrôle.

2.3.1.2) Mesure de la production mitochondriale d'anions superoxydes

Le réactif MitoSOX™ Red est un composé qui pénètre dans les cellules vivantes et cible sélectivement les mitochondries. Il est alors rapidement oxydé par l'anion superoxyde (et uniquement par lui) ; le produit une fois oxydé devient fortement fluorescent.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 200 000 cellules par puits (≈ 100 000 cellules/ cm², TPP, 92024) et cultivées dans du milieu DMEM pendant 24h. Les cellules ont été ensuite traitées par du DMEM (cellules contrôles), du glutamate (100mM), de l'H₂O₂ (2mM, produit oxydant de référence) et par les NPC nues, ICONS 30, 36 et 73 à 100μg/mL dans du milieu DMEM sans SVF et sans rouge phénol (Gibco, 21063-09) pendant 4h ou 24h.

Après incubation des différents traitements, les cellules sont lavées trois fois par du PBS, puis décollées par la trypsine pendant 5 minutes à 37°C. La trypsine est désactivée par ajout de milieu

complet DMEM sans rouge phénol, puis les cellules sont récupérées dans des tubes eppendorf, centrifugées pendant 5 minutes à 100g et le surnageant est éliminé. Le réactif MitoSOX™ Red (Thermofisher, M36008) est dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS (concentration finale de 5µM). Puis 100µL de cette solution sont déposés dans chaque tube pendant 20 minutes puis 400µL de PBS – BSA 1g/L (ID Bio, 1000-70) – EDTA (200nM – Sigma, ED4SS) sont rajoutés dans chaque tube ; les tubes sont conservés sur glace avant passage au FACS (Millipore Guava Easy Cyte Ds200) aux longueurs d'ondes d'excitation de 488nm et d'émission de 580nm.

2.3.2) Évaluation de la consommation des systèmes antioxydants

2.3.2.1) Mesure des thiols totaux

Les fonctions thiols (-SH) jouent un rôle majeur dans le maintien de l'état redox des cellules. Elles représentent en effet une des premières barrières face aux ERO qui les oxydent, conduisant notamment à la formation de ponts disulfure S-S. Une diminution de la quantité de thiols totaux est donc le reflet d'un stress oxydant.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 50 000 cellules par puits ($\approx 100\,000$ cellules/cm², TPP, 92096) dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont été ensuite traitées par du DMEM (cellules contrôles), du glutamate (100mM) et les NPC nues, ICONS 30, 36 et 73 à 100 µg/mL dans du milieu DMEM sans SVF et sans rouge phénol (Gibco, 21063-09) pendant 4h ou 24h.

Après les traitements, les puits sont vidés et lavés une fois avec du PBS. Puis 50µL de PBS sont ajoutés dans chaque puits, trois cycles de congélation/ décongélation sont réalisés en passant les plaques de -80°C à +37°C. Parallèlement, une gamme de Glutathion réduit (GSH, Sigma G4251) de 0 à 50µM est réalisée. Une solution de Thiol Green Indicator 2X (156049, Abcam, Paris, France) est réalisée et diluée au ½ dans chaque puits. La fluorescence est mesurée à T0 et à T20 minutes à une longueur d'onde d'excitation de 485nm et une longueur d'onde d'émission de 535nm.

Les protéines sont ensuite précipitées par ajout d'acide trichloracétique (TCA, Sigma T4885) à 50% dilué au ½ dans chaque puits. Après aspiration/refoulement, les homogénats sont collectés dans des tubes eppendorfs puis centrifugés à 10 000g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants sont retirés et le culot protéique est dissocié dans 60µL de NaOH 1M. Pour le dosage des protéines, le milieu réactionnel est composé du réactif A : Acide bicinchoninique, carbonate de sodium, tartrate de sodium, bicarbonate de sodium, 0,1N NaOH (Sigma, B9643) et du réactif B : 4% de pentahydrate de

sulfate de fer II (Sigma, C2284) selon un rapport de 50 :1. Un volume de 20µL de la gamme de BSA (Sigma A3059 de 0,1 à 1,5mg/mL) et des échantillons est déposé en duplicata. Puis 200µL de milieu réactionnel sont ajoutés dans chaque puits, la plaque est incubée 20 minutes à 37°C puis lue à 562nm (BMG Labtech, SpectroStar Nano).

Les résultats sont exprimés en µmol de thiols totaux par g de protéines.

2.3.2.2) Mesure du glutathion

Le glutathion est un tripeptide composé d'acide glutamique, de glycine et de cystéine, cette dernière comportant un groupement thiol. Le glutathion joue donc un rôle clé dans le maintien du potentiel rédox en se présentant sous forme réduite GSH ou oxydée GSSG ; une consommation du glutathion reflète un stress oxydant.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 200 000 cellules par puits ($\approx 100\ 000$ cellules/ cm^2 , TPP, 92096) dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont été ensuite traitées par du DMEM (cellules contrôles), du glutamate (100mM) et par les NPC nues, ICONS 30, 36 et 73 à 100 µg/mL dans du milieu DMEM sans SVF et sans rouge phénol (Gibco, 21063-09) pendant 4h ou 24h.

Les cellules cultivées en plaque de 24 puits sont grattées sur glace avec 50µL d'acide sulfosalicylique 5% (SSA - 1.00691, Merck, VWR) / EDTA froid (Sigma, ED4SS) après avoir retiré le surnageant. Les homogénats sont centrifugés à 10 000g pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants sont utilisés pour le dosage du glutathion et les culots pour le dosage des protéines.

Pour le dosage du glutathion total, le milieu réactionnel est constitué de NADPH à 0,3M (Sigma N7505), de DNTB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) à 6mM (Sigma, D8130) et de la Glutathion réductase à 5U/mL (Sigma, G3664) dilué dans de l'eau distillée. Un volume de 5µL de la gamme de glutathion (Sigma G4251 de 2,5 à 25µM) et de chaque échantillon est déposé en duplicata, puis 235µL de milieu réactionnel est ajouté. La lecture en cinétique sur 5 minutes à 410nm est démarrée immédiatement après ajout des réactifs (BMG Labtech, SpectroStar Nano). La figure 35 présente le principe du dosage du glutathion.

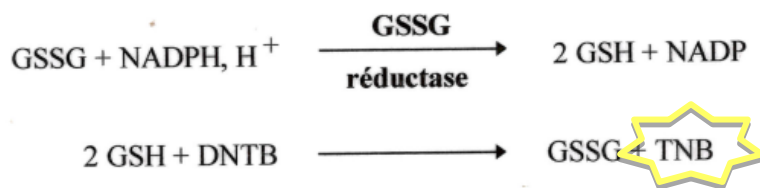


Figure 35 : Principe du dosage du glutathion.

Le glutathion réduit (GSH) réagit directement avec le DNTB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) pour former du TNB (2-nitro-5-thiobenzoate anion) qui absorbe à 410nm. Le glutathion oxydé GSSG est converti en GSH par la glutathion réductase et peut ainsi réagir avec le DNTB pour former du TNB. La quantité de TNB formé est ainsi directement proportionnelle à la quantité de glutathion dans l'échantillon.

Pour le dosage des protéines, les culots sont dissociés dans 60µL de NaOH 1M. Les protéines sont dosées par la méthode BCA décrite précédemment. Les résultats sont exprimés en µmol de glutathion par mg de protéines.

2.3.3) Évaluation des conséquences du stress oxydant

Les radicaux libres peuvent induire des dommages sur les protéines, les lipides et l'ADN. Concernant l'ADN, la guanine est la base la plus susceptible aux dommages oxydatifs, la modification principale consistant en son oxydation en 8-hydroxyguanine (ou 8-OHdG). Une augmentation de 8-OHdG témoigne par conséquent d'un stress oxydant.

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits contenant des lamelles en verre Knittel Glass, Brunswick, Allemagne) au fonds des puits, à une densité de 200 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules sont ensuite traitées par le DMEM (cellules contrôles), par le glutamate (100mM) et par les NPC nues, ICONS 30, 36 et 73 (100 µg/mL) dans du milieu DMEM sans SVF et sans rouge phénol (Gibco, 21063-09) pendant 4h ou 24h.

Les puits des plaques 24 puits sont vidés et lavés trois fois par du PBS. Les cellules sont ensuite fixées par le PFA 4% (169650025, ACROS, Fisher Scientific) pendant 12 minutes, puis lavées deux fois par du PBS. Les sites non spécifiques sont bloqués par du PBS – sérum de chèvre 5% (Sigma, G9023 – Lot SCBL5146V) - triton 0,1% (Sigma, 516813) pendant 30 minutes. L'anticorps anti-8-OHdG de souris (SantaCruz, sc66036 Clone 15A3) est incubé au 1/100^{ème} toute la nuit à 4°C. Les puits sont lavés 3 fois avec du PBS puis l'anticorps secondaire, AlexaFluor anti-souris A555 (Invitrogen, A11003) est incubé au 1/500^{ème} pendant 2h à température ambiante. Les puits sont lavés 3 fois par du PBS puis le DAPI

est incubé sur les cellules à 0,1µg/mL dans du PBS (Merck Millipore, 268298). Les lamelles sont lavées et montées avec le mowiol (Mowiol Sigma 81381, Glycerol Merck 4094 ratio 1 :2.5) sur des lames de microscopie (Roth, Superfrost 2109). Les images sont prises au microscope à épifluorescence (Zeiss Axiophot, Marly le Roi, France) à une longueur d'onde de 550nm.

Les analyses sont réalisées sur le logiciel Image J. L'analyse suivante nous permet de séparer le marquage nucléaire assimilé à l'oxydation de l'ADN du marquage cytoplasmique assimilé à l'oxydation de l'ARN.

L'intensité de fluorescence totale est quantifiée avec la fonction RID (Raw Integrated Density) qui additionne l'intensité de chaque pixel. Le bruit de fond est calculé en RID sur une petite région sans marquage puis étendu à l'image totale (= RID bruit de fond / aire bruit de fond x aire totale). Enfin, un seuil est réalisé sur la photo du DAPI qui permet de quantifier le nombre de noyaux et de conserver les ROIs (Region of Interest) des noyaux pour la suite de l'analyse. L'intensité du signal pour l'image totale (nucléaire [ADN] et cytoplasmique [ARN]) est donc calculée par la formule suivante : $(RID \text{ Total} - RID \text{ bruit de fond}) / \text{nombre de noyaux}$ représentant l'oxydation des acides nucléiques (ARN et ADN) par cellule.

Pour la quantification des RID nucléaires, les ROIs du DAPI sont réutilisés et la RID est calculée sur chaque noyau, puis additionnée. On obtient par conséquent le RID uniquement nucléaire. Le bruit de fond est calculé pour l'aire des noyaux uniquement (= RID bruit de fond / aire bruit de fond x aire des noyaux). Cette valeur est ensuite divisée par le nombre de noyau. La formule est donc : $(RID \text{ nucléaire} - RID \text{ bruit de fond nucléaire}) / \text{nombre de noyaux}$ représentant l'oxydation de l'ADN par cellule.

Pour la quantification des RID cytoplasmiques, la RID nucléaire est retranchée à la RID totale. Les bruits de fond sont également retranchés : (bruit de fond total – bruit de fond nucléaire). Cette valeur est ensuite également divisée par le nombre de noyaux : $[(RID \text{ totale} - RID \text{ nucléaire}) - (\text{bruit de fond total} - \text{bruit de fond nucléaire})] / \text{nombre de noyaux}$ représentant l'oxydation de l'ARN par cellule.

2.4) Etude de l'internalisation des NPC dans les cellules bEnd.3

L'internalisation des NPC dans les cellules endothéliales a été étudiée par différentes techniques. Tout d'abord, une approche quantitative a été réalisée par ICP-OES et cytométrie en flux. La

localisation intracellulaire des NPC a ensuite été recherchée par microscopie à fluorescence et par microscopie électronique à transmission.

2.4.1) Quantification de l'internalisation des NPC dans les cellules bEnd.3

Deux techniques ont été utilisées afin de quantifier l'internalisation des NPC dans les cellules bEnd.3 : l'ICP-OES et la cytométrie en flux avec les NPC fonctionnalisées par la cyanine.

2.4.1.1) Analyse quantitative de l'internalisation des NPC par ICP-OES

La technique d'ICP-OES (spectrométrie d'émission atomique à couplage inductif) consiste en la détection des éléments par ionisation. Les échantillons sont injectés dans un plasma d'argon (>6 000°K) provoquant l'ionisation des atomes. En retournant à leur état fondamental, les électrons des atomes ionisés émettent un photon dont l'énergie est caractéristique de l'élément.

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 1 000 000 cellules ($\approx 100\,000$ cellules/ cm^2 , TPP, 92006) par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules sont traitées par les NPC nues, ICONS, 30, 36 et 73 à 1, 10, 100 et 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 24h. Après ces traitements, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS. Le surnageant (2mL) ainsi que le premier lavage (1mL) sont récupérés dans des tubes falcons de 15mL. Puis 2mL d'acide nitrique à 70% (HNO_3 , Prolabo, 20.425.297) sont ajoutés sur les cellules qui sont décollées et digérées par aspiration/refoulement puis collectées dans des fioles en verre borosilicaté de 16mL (Fisher Scientific, 10504291). Puis 3,6mL d' H_2O_2 à 10M sont ajoutés dans les tubes, la phase liquide est ensuite évaporée à 90°C. Les résidus à sec sont repris dans 5mL d' HNO_3 ultrapur à 70% puis analysés par ICP-OES à l'Institut de Physique du Globe de Paris. Différents contrôles négatifs sont réalisés afin de démontrer l'absence de cérium dans les différents réactifs (HNO_3 , DMEM, PBS) et dans les cellules. Un contrôle positif avec des cellules contenant une quantité connue de NPC (1mg) ajouté après digestion des cellules est également réalisé.

2.4.1.2) Évaluation par cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de faire défiler des éléments, ici des cellules, à grande vitesse devant un faisceau laser en les caractérisant individuellement (Figure 36). La première phase permet de caractériser les cellules selon deux critères, leur taille et leur granulosité, et ainsi de sélectionner les cellules viables. Puis, la fluorescence de chaque cellule est mesurée, afin de détecter ainsi la présence de fluorophore et donc de NPC.

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 200 000 cellules par puits dans du milieu DMEM, et cultivées pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées par le DMEM (cellules contrôles) et les NPC ICONS 30, 36-Cy5 et 73-Cy5 (100 µg/mL) dans du milieu DMEM sans SVF et sans rouge phénol (Gibco, 21063-09) pendant 4h ou 24h.

Après les traitements, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS afin d'éliminer les NPC non fixées/internalisées. Les cellules sont détachées des puits par 200µL de trypsine (inactivée par 800µl de milieu complet sans rouge de phénol), puis centrifugées à 100g pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite reprises dans 400µL de PBS – BSA 1g/L (ID Bio, 1000-70) – EDTA 200nM (Sigma, ED4SS). Les cellules sont conservées à 4°C. La fixation/internalisation est quantifiée par cytométrie en flux aux longueurs d'ondes d'excitation de 640nm et d'émission de 660nm (Millipore Guava Easy Cyte Ds200).

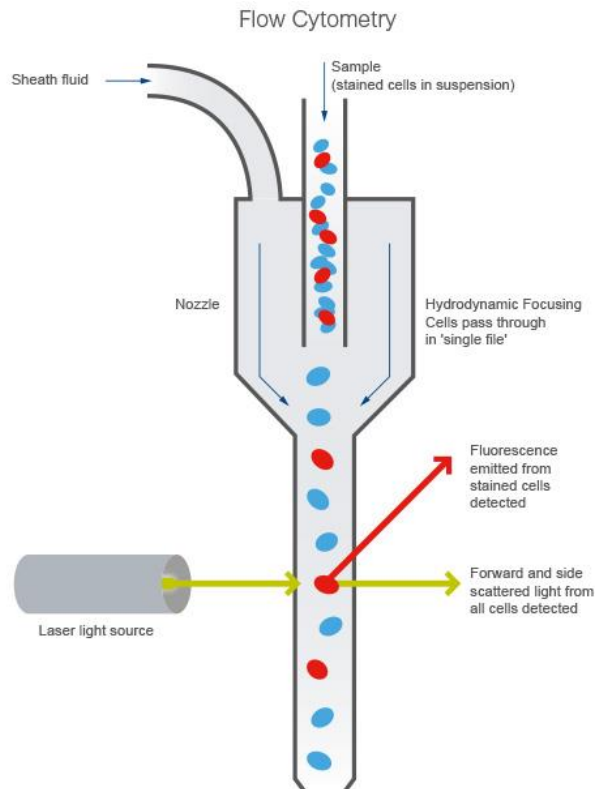


Figure 36 : Principe de la cytométrie en flux.

La cytométrie en flux permet de faire défiler les cellules, à grande vitesse devant un faisceau laser en les caractérisant individuellement. La première étape permet de caractériser les cellules selon deux critères, leur taille et leur granulosité, permettant ainsi de sélectionner les cellules viables. Puis, la fluorescence de chaque cellule est mesurée, afin de détecter la présence de fluorophore et donc de NPC.

2.4.2) Localisation intracellulaire des NPC

Deux techniques ont été utilisées afin d'étudier la localisation des NPC dans les cellules bEnd.3 : la microscopie confocale à fluorescence à partir des NPC fonctionnalisées par un fluorochrome et la microscopie électronique pour la localisation subcellulaire.

2.4.2.1) Evaluation par microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence est une technique utilisant la microscopie optique et un laser réglé sur la longueur d'onde d'excitation d'un fluorophore. Ce fluorophore excité émet des photons (à une

longueur d'onde d'émission), et un filtre permet la séparation des photos d'émission/excitation. Ceci permet la visualisation et l'acquisition des photons émis par le fluorophore.

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées sur des lamelles en verre (Knittel Glass, Brunswick, Allemagne) dans des plaques 24 puits à une densité de 200 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules sont ensuite traitées par le DMEM (cellules contrôles) et par les NPC ICONS 30, 36-Cy5 et 73-Cy5 (100 µg/mL) dans du milieu DMEM sans SVF et sans rouge phénol (Gibco, 21063-09) pendant 4h ou 24h.

Après incubation avec les NPC, les cellules sont lavées 3 fois par du PBS afin d'éliminer celles qui ne sont pas fixées/internalisées. Les cellules sont fixées par du PFA à 4% (ACROS, 169650025) avec 0,5% de Triton X100 (Sigma, 516813) durant 12 minutes, puis lavées 3 fois à nouveau. Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine A488 au 1/50^{ème} pendant 15 minutes (Thermofisher, A12379) puis les lamelles sont lavées 3 fois avec par le PBS. Le DAPI (Merck Millipore, 268298) est incubé sur les cellules à 0,1µg/mL dans du PBS pendant 5 minutes, suivi de 3 derniers lavages par le PBS. Enfin, les lamelles sont fixées par du mowiol (Mowiol Sigma 81381, Glycerol Merck 4094 ratio 1 :2.5) sur des lames porte objet de microscopie en verre (Roth, Superfrost 2109). Les lames sont observées au microscope confocal Leica (DMI8 ; Leica Microsystems ; Wetrilar, Allemagne).

2.4.2.2) Microscopie électronique

La microscopie électronique utilise un faisceau d'électrons à la place des photons. Le faisceau traverse l'échantillon qui le modifie selon sa forme et sa nature. Ainsi, les zones peu denses ou vides ne perturbent pas le faisceau d'électrons et apparaissent claires. A l'inverse, les éléments denses (comme les NPC) retiendront les électrons et apparaîtront sombres sur les images.

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 1 000 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules sont ensuite traitées par des NP « NM212 » utilisées comme référence et les NPC ICONS 30 et 36 (1000 µg/mL) dans du milieu DMEM sans SVF et sans rouge phénol (Gibco, 21063-09) pendant 24h.

Après incubation avec les NPC, les cellules sont lavées par du PBS puis fixées par du glutaraldéhyde 1% et du PFA 2,5% à 4°C pendant 48h. Deux lavages sont ensuite réalisés par du PBS, puis les cellules sont grattées et incluses en gélatine à 2%, les culots sont récupérés en tubes eppendorf et centrifugés à 250g pendant 1 minute. Deux lavages sont réalisés avec du PBS, suivis d'une deuxième fixation par du tetroxide d'osmium à 1% (OsO₄) et du ferrate de potassium (FeK) 1h à température

ambiante. Deux nouveaux lavages par du PBS sont réalisés avant l'enrobage en agarose à 1% puis la découpe en cubes. L'étape de déshydratation se réalise par des bains successifs d'éthanol : à 30% (15min), à 50% (15min), à 70% (15min), à 90% (15min) et à 100% (2 fois 15 min) puis 100% d'éthanol avec de l'oxyde de propylène (2 fois 15 minutes). L'imprégnation se réalise en oxyde de propylène/résine époxy (Épon ; Ratio 1 :1) toute la nuit, puis 2 bains de 1h d'Épon. L'inclusion est réalisée à plat suivie par la polymérisation à 60°C pendant 18h. Les images sont réalisées sur un appareil Tecnai 12, microscope électronique à transmission fonctionnant à 80kV et équipé d'une caméra Keen View 1K x 1K (Tecnai, FEI company, Hillsboro, Oregon, États-Unis).

2.4.3) Ciblage de VCAM par les NPC dans les cellules bEnd.3

2.4.3.1) Localisation des NPC ciblantes par microscopie électronique

Les cellules ont été traitées par les NPC ICONS 36 fonctionnalisées par la cyanine et le peptide non ciblant scramble (ICONS 36-Cy5-Scramble) ou le peptide ciblant (ICONS 36-Cy5-Peptide). La microscopie à fluorescence permet de comparer la localisation et d'estimer la quantité de NPC (méthode semi quantitative) des NPC ICONS 36-Cy5-Scramble ou peptide.

Dans ces études, les cellules ont étéensemencées à une densité de 200 000 cellules/ puits dans des plaques 24 puits ($\approx 100\,000$ cellules/ cm^2 , TPP, 92024) sur des lamelles en verre (Knittel Glass, Brunswick, Allemagne). Les cellules sont ensuite traitées par les NPC ICONS 36-Cy5-Scramble ou ICONS 36-Cy5-Peptide à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 60 minutes.

Après incubation avec les NPC, les cellules sont lavées 3 fois par du PBS afin d'éliminer celles qui ne sont pas fixées/internalisées. Les cellules sont fixées par du PFA à 4% (ACROS, 169650025) avec 0,5% de Triton X100 (Sigma, 516813) durant 12 minutes, puis lavées 3 fois à nouveau. Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine A488 au 1/50^{ème} pendant 15 minutes (Thermofisher, A12379) puis les lamelles sont lavées 3 fois avec par le PBS. Le DAPI (Merck Millipore, 268298) est incubé sur les cellules à 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du PBS pendant 5 minutes, suivi de 3 derniers lavages par le PBS. Enfin, les lamelles sont fixées par du mowiol (Mowiol Sigma 81381, Glycerol Merck 4094 ratio 1 :2.5) sur des lames porte objet de microscopie en verre (Roth, Superfrost 2109). Les lames sont observées au microscope confocal Leica (DMI8 ; Leica Microsystems ; Wetzlar, Allemagne).

2.4.3.2) Mise au point du modèle de sur-expression de VCAM

Deux techniques complémentaires ont été utilisées : la cytométrie en flux afin d'obtenir des données quantitatives et la microscopie à fluorescence pour acquérir des données qualitatives.

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 200 000 cellules par puits sur des lamelles en verre (pour la microscopie à fluorescence uniquement) dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules sont traitées par du DMEM (contrôle) ou par du LPS à 10 ou 50µg/mL pendant 24h.

- Cytométrie en flux : Après les traitements, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS afin d'éliminer les NPC non fixées/ internalisées. Les cellules sont détachées des puits par 200µL de trypsine (inactivée par 800µl de milieu complet sans rouge de phénol), puis centrifugées à 100g pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite reprises dans 500µL de PBS – BSA 0,5% (ID Bio, 1000-70) pendant 30 minutes afin de bloquer les sites non spécifiques. L'anticorps primaire (Tableau XXII) est incubé pendant 30 minutes à 4°C, les cellules sont lavées 3 fois puis l'anticorps secondaire (Tableau XXII) est également incubé pendant 30 minutes à 4°C. La fixation/internalisation est quantifiée par cytométrie en flux aux longueurs d'ondes d'excitation de 640nm et d'émission de 660nm (Millipore Guava Easy Cyte Ds200).

- Microscopie à fluorescence : Après incubation avec les NPC, les cellules sont lavées 3 fois par du PBS afin d'éliminer celles qui ne sont pas fixées/internalisées. Les cellules sont fixées par du PFA à 4% (ACROS, 169650025) avec 0,5% de Triton X100 (Sigma, 516813) durant 12 minutes, puis lavées 3 fois à nouveau. Les sites non spécifiques sont bloqués par du PBS – sérum de chèvre 5% (Sigma, G9023 – Lot SCBL5146V) pendant 30 minutes. L'anticorps primaire (Tableau XXII) est incubé toute la nuit à 4°C et l'anticorps secondaire (Tableau XXII) est incubé pendant 2h à 37°C. Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine A488 au 1/50ème pendant 15 minutes (Thermofisher, A12379) puis les lamelles sont lavées 3 fois avec par le PBS. Le DAPI (Merck Millipore, 268298) est incubé sur les cellules à 0,1µg/mL dans du PBS pendant 5 minutes, suivi de 3 derniers lavages par le PBS. Enfin, les lamelles sont fixées par du mowiol (Mowiol Sigma 81381, Glycerol Merck 4094 ratio 1 :2.5) sur des lames porte objet de microscopie en verre (Roth, Superfrost 2109). Les images sont prises au microscope à épifluorescence (Zeiss Axiophot, Marly le Roi, France) à une longueur d'onde de 550nm.

3) Études *in vivo*

3.1) Animaux

Des souris mâles Swiss de 26g âgées de 4 semaines (Janvier, Genest-Saint-Isle, France) ont été utilisées. Les animaux sont mis en stabulation pendant une semaine dans l'animalerie où la température, l'hygrométrie et la lumière (cycle de 12h) sont contrôlés. La nourriture et l'eau sont fournies *ad libitum*. Pour les études d'ischémie, les animaux sont mis à mort 24 heures après l'opération. Les deux procédures ont été acceptées par le comité d'éthique et validées par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (Projet APAFIS #13638 pour les études de biodistribution/ toxicité et Projet APAFIS #20868 pour les études d'ischémie).

3.2) Biodistribution et toxicité des NPC

3.2.1) Design de l'étude

Pour l'étude de biodistribution et de toxicité *in vivo* des NPC, la dose utilisée est de 5mg/kg par voie intraveineuse (dose maximale qui sera testée dans le modèle d'ischémie). Deux nanoparticules sont utilisées, les ICONS 30 et les ICONS 73 couplées à la cyanine 5 afin de suivre la biodistribution à différents temps. Un premier groupe de souris est mis à mort 24h après l'injection et un deuxième groupe un mois après. Diverses expérimentations sont réalisées sur les souris qui sont détaillés ci-dessous.

3.2.2) Imagerie

Après injections des NPC les animaux sont anesthésiés par l'isoflurane (30% + 70% d'air) et placés dans un Photon Imager (Biospace Lab, Nesles-la-Vallée, France) qui permet de détecter, localiser et quantifier la fluorescence sur souris vivante. Pour le groupe de souris mis à mort à 24h, des acquisitions sont réalisées 5, 15, 30 minutes et 1, 3 et 6 heures après injection. Pour le groupe mis à mort à 1 mois, une série d'acquisitions est réalisée 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 28 jours après injection. Des régions d'intérêts (ROI) permettent de délimiter les organes et de quantifier l'intensité de fluorescence. L'intensité de fluorescence est exprimée en photon/seconde/cm²/stéradian. L'intensité

de fluorescence (IF) des ROI est exprimée en unité arbitraire (UA) et calculée à partir de la formule suivante :

$$\text{IF (UA)}: \frac{(\text{Intensité de fluorescence de la ROI à Tx} - \text{Intensité de fluorescence de la ROI contrôle à Tx}) / \text{Intensité de Fluorescence de la ROI à T}_{5\text{min}}}{\text{Intensité de fluorescence du standard cyanine à Tx}}$$

3.2.3) NFS

Le jour de la mise à mort des animaux, les souris sont anesthésiées par voie i.p (0,1mL/10g) par un mélange de kétamine (50mg/kg) et xylazine (6mg/kg). Un prélèvement de sang intracardiaque est réalisé, et le sang est déposé dans deux tubes eppendorf contenant 5µL d'EDTA 0,5M (Sigma, 03660). Un tube est centrifugé à 12 000g pendant 10 minutes à 4°C, le sérum est prélevé et congelé à -40°C pour la réalisation ultérieure de dosages biochimiques (ASAT/ ALAT). Le deuxième tube est utilisé pour une numération et une formule sanguines (NFS ; MS95, Melet Schloesing Laboratoires, Osny, France). Parmi les paramètres mesurés, voici ceux retenus pour notre étude :

- Numération **leucocytaire** en Millions/mm³ (lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles, et basophiles, en %)
- Numération **érythrocytaire** en Millions/mm³, hémocrite (%), hémoglobine (g/dl), volume globulaire moyen (VGM en fl), teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH en pg) et concentration corpusculaire en hémoglobine (CCMH en g/dl)
- Numération **plaquettaire** en milliers/mm³

3.2.4) Histologie

L'histologie est réalisée sur 5 organes : le foie, les reins, la rate, les poumons et le cerveau. Après mise à mort des animaux, les organes sont prélevés immédiatement et directement plongés dans le PFA 4% (Euromedex, 16%, 15700, Souffelweyersheim, France) pendant au minimum 24h. Les poumons sont gonflés avec le PFA avec l'aide d'une seringue et d'un cathéter flexible inséré dans la trachée. L'inclusion, les coupes, la coloration ont été réalisées par la plateforme PETRA (Pathologie Expérimentale et Translationnelle) à l'Institut Gustave Roussy (Villejuif). Les échantillons sont ensuite déshydratés par des bains d'alcool à 70%, 100% et par l'isopropanol, puis incorporés dans de la paraffine avec du LOGOS afin de déshydrater et clarifier les échantillons (MM, France). Des coupes de 4µm sont réalisées avec un microtome et séchées à 37°C. Une coloration HES est réalisée puis du

milieu de montage (Pertex) est utilisé pour coller une lamelle sur la section de tissu. Chaque lame est observée à l'aide d'un microscope Zeiss Axiophot et les photos sont prises à l'aide de Cameware.

3.2.5) Quantification des NPC

Les quantifications sont également réalisées sur 5 organes : le foie, les reins, la rate, les poumons et le cerveau. Après mise à mort des animaux, les organes sont prélevés et séparés en deux, la moitié est utilisée pour les quantifications par dosage de la cyanine et l'autre moitié pour le dosage du cérium par ICP. Ils sont congelés à -40°C jusqu'au jour du dosage.

3.2.5.1) Quantification de la cyanine

Les organes sont décongelés le jour du dosage, pesés et placés dans des tubes de 5 et 7mL contenant des billes en céramique (1,4/2,8mm ou 2,8mm uniquement) pour le broyage (P000918 et 935, Precellys Lysing Kit, Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France). Du PBS/ triton 0,1% est ajouté (1mL pour le foie et les reins et 0,5mL pour la rate et le poumon). Les organes sont broyés mécaniquement par les billes par deux cycles d'agitation à 6000 RPM de 30 secondes (02520-300R-D000, Precellys evolution, Bertin Technologie, Montigny-le-Bretonneux, France), entre les deux cycles les échantillons sont déposés sur la glace.

En fonction du poids de chaque organe, un volume de PBS/ triton 0,1% est ajouté après le broyage (5mL/g pour le foie et les reins et 7mL/g pour la rate et les poumons) selon la formule suivante :

Volume à ajouter= masse de l'organe (g) x 5 ou 7 (mL) – volume de l'organe (= masse x densité).

Les densités des organes étudiés sont les suivantes : foie : 0,99 – rate : 1,01 – rein : 0,97 – poumon 0,6. Les broyats sont ensuite centrifugés à 10 000g pendant 10 min afin d'éliminer la fraction insoluble. Les échantillons sont analysés au fluorimètre ($\lambda_{\text{excitation}} = 620\text{nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 670\text{nm}$) afin de quantifier la cyanine. Une gamme de NPC réalisés dans les broyats d'organes permet de déterminer la quantité de NPC en μg par g de tissu.

3.2.6) Dosage sanguin des transaminases hépatiques (ASAT/ ALAT)

L'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT) sont des transaminases. Ces enzymes se retrouvent en quantité importante dans le foie et les muscles. Leur activité élevée reflète une atteinte hépatique mais également musculaire.

Le sang est prélevé par voie intracardiaque ($\approx 1\text{mL}$) après anesthésie des animaux dans un tube eppendorf contenant $5\mu\text{L}$ d'EDTA à $0,5\text{M}$. Environ $500\mu\text{L}$ de sang est centrifugé à $12\,000\text{g}$ pendant 10 minutes à 4°C , le sérum est prélevé, aliquoté et conservé à -40°C . Le sérum est décongelé le jour du dosage, l'ALAT et l'ASAT sont dosées au centre de biochimie automatisé de l'hôpital Necker (Hôpital Necker – Enfants malades, Paris).

3.3) Modèle d'ischémie cérébrale par injection de thrombine dans la ACM

Le modèle d'ischémie cérébrale consiste à induire chez la souris la formation d'un caillot par injection de thrombine dans l'artère cérébrale moyenne (ACM) à l'aide d'une micropipette (Figure 37).

Des pipettes de prélèvement hématologique non héparinées (023555/5 ; DM LABO, Bretteville-sur-Odon, France) sont placées sur une étireuse à verre (Geitros München) dont la température est réglée à environ 300°C et la force de l'aimant sur 150. La pipette ainsi étirée et scindée en deux permet d'obtenir deux micropipettes dont l'extrémité est coupée en biseau à l'aide d'une paire de microciseaux sous une loupe binoculaire (Zeiss OPMI 1-FC).

Le jour de l'opération, la micropipette est remplie avec $1\mu\text{L}$ ($=15\text{mm}$ sur la pipette) de thrombine humaine à $1\text{U}/\mu\text{L}$ (9-HCT-0020, Cryopep, Montpellier, France) avec l'aide d'une seringue de 10mL prolongée d'un cathéter ; la micropipette remplie est conservée à 4°C jusqu'à son utilisation.

De la buprénorphine ($0,05\text{mg}/\text{kg}$ à $10\text{mL}/\text{kg}$ dans du sérum physiologique) est injectée 30 minutes avant le début de l'ischémie ainsi qu'en fin de journée. La souris est anesthésiée avec un mélange de kétamine ($50\text{mg}/\text{kg}$) et xylazine ($6\text{mg}/\text{kg}$) à $0,1\text{mL}/10\text{g}$ dans du sérum physiologique. La température corporelle est régulée tout au long de l'opération par une couverture thermostatée (K10255 ; Harvard Apparatus, Les Ulis, France). Du gel ophtalmique est déposé sur les yeux de la souris (Ocry-gel, TVM lab, Lempdes, France), puis la souris est fixée sur un appareil de stéréotaxie (Narishige, Tokyo, Japon). Toutes les étapes sont réalisées sous une loupe binoculaire (Zeiss OPMI 1-FC). Une incision de la peau est réalisée entre l'œil et l'oreille gauche. Le muscle masséter est dissocié de la

crête osseuse puis un micro-clamp est placé afin de maintenir la peau et le muscle masséter pour une meilleure visibilité et accessibilité. La boîte crânienne est humidifiée avec un coton et du sérum physiologique (NaCl 0,9%), la crête osseuse est affinée à l'aide d'une fraise dentaire (Mod.40.E, Micro Mega, Besançon, France) et une craniotomie (\varnothing 0,8-1 mm) est réalisée au niveau de l'ACM. La dure-mère est retirée au niveau d'une bifurcation de l'ACM. Une sonde laser Doppler (IEC-601-1, Moor Instrument, Millwey, Royaume-Uni) est positionnée sur la partie distale de l'ACM pour y enregistrer le débit sanguin, après un amincissement de la boîte crânienne et le dépôt d'une goutte d'huile de vaseline afin d'éviter l'opacification. Le débit est enregistré 5-10 minutes avant l'injection. La micropipette montée sur le micromanipulateur de l'appareil stéréotaxique est reliée à une seringue remplie d'air.

La micropipette est insérée dans l'ACM et la thrombine est injectée par compression de l'air dans la seringue. La micropipette est retirée 15 à 20 min après le début de l'injection, lorsque le caillot est stable. Le débit sanguin cérébral est suivi tout au long de l'ischémie. Le seuil minimal accepté est une chute du DSC d'au moins 50% pendant 30 minutes.

Des points de sutures sont réalisés et la souris est mise dans une couveuse à 30°C pendant 24h.

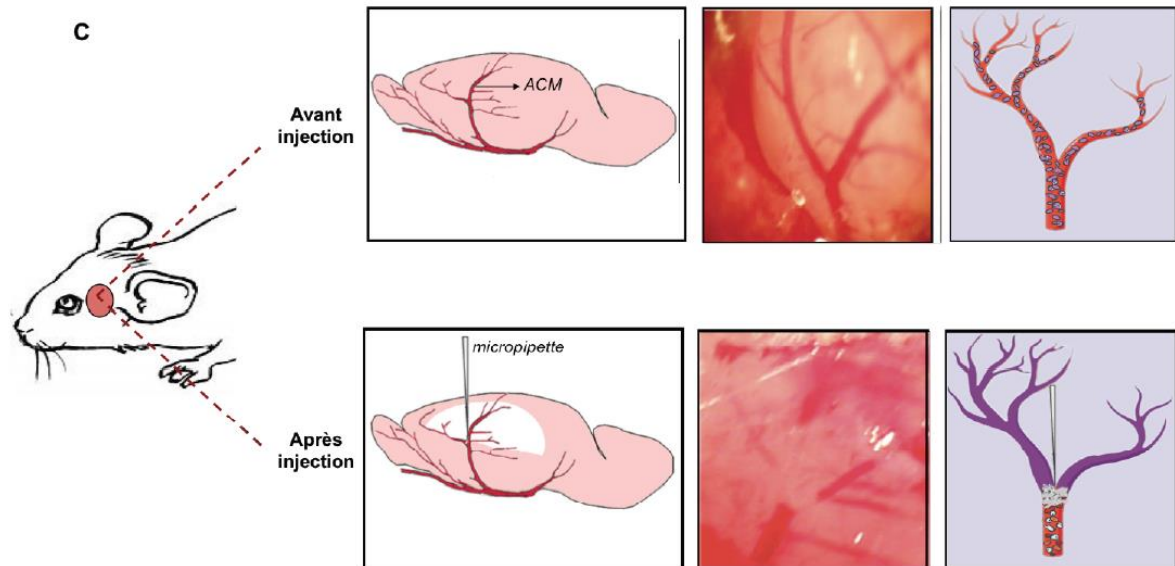


Figure 37 : Modèle d'ischémie par injection de thrombine sur la souris.

L'injection de thrombine permet la formation d'un caillot sanguin. Cette injection est réalisée au niveau de l'ACM, entre l'œil et l'oreille de la souris. La micropipette est insérée au niveau d'une bifurcation de l'ACM, puis la thrombine est injectée, formant ainsi un caillot sanguin, et permettant de réduire le DSC.

3.4) Étude de l'effet des ICONS 73 dans l'ischémie cérébrale

3.4.1) Modèle

Les nanoparticules ICONS-73 couplées à la cyanine sont injectées par voie intraveineuse à 3 doses : 0,5 - 1 et 5mg/kg, juste après l'injection de thrombine. Les animaux sont mis à mort 24h après l'ischémie. Le sang est prélevé dans la veine cave avec une aiguille de 25G (Terumo 25G, AN*2516R1, Guyancourt, France) et placé dans un tube contenant 5µL d'EDTA à 0,5M (Sigma, 03660). Le sang est centrifugé à 12 000g pendant 10 minutes à 4°C, le sérum est collecté et congelé à -40°C. La souris est ensuite perfusée avec du NaCl 0,9% pendant 5 minutes à une pression de 10mm de Hg. Le cerveau est prélevé et des coupes coronales de 1mm d'épaisseur sont réalisées (Mc Ilwain Tissue Chopper, Surrey, Angleterre). Les coupes 1, 2, 4, 6 et 7 (sens frontal => occipital) sont utilisées pour le calcul du volume de lésion, puis le cortex est récupéré et congelé à -40°C. Les coupes 3 et 5 sont congelées dans du tissue-tek (Sakura, Pays-Bas) et utilisées ultérieurement pour réaliser des coupes au cryostat.

3.4.2) Volume de lésion

Comme décrit précédemment, les coupes 1, 2, 4, 6 et 7 sont utilisées pour calculer le volume de lésion. Ces coupes sont plongées dans du chlorure de triphényltétrazolium à 2% (TTC). Le TTC est utilisé pour identifier les tissus au métabolisme actif de ceux qui sont inactifs : le TTC incolore est réduit en TPF (1,3,5-triphénylformazan), dans les tissus viables *via* les déshydrogénases. Ainsi, les zones nécrosées/ischémisées restent blanches, et les tissus vivants sont colorés en rouge. Après 1h d'incubation à l'abri de la lumière, les coupes sont déposées sur une lame de microscopie (Roth, Superfrost 2109) et prises en photos recto et verso (le verso de la coupe 2 correspondant au recto de la coupe 3 manquante, idem pour la coupe 5). L'acquisition est réalisée avec une caméra numérique (Moticam 5.0MP, Motic, Le Mans, France) *via* le logiciel Motic Image Plus. Une feuille de papier millimétré placée sous la lame de microscopie permet de rentrer l'échelle en mm sur chaque photo. Après l'acquisition, les cortex sont récupérés, placés dans tubes Eppendorf et congelés à -40°C.

Pour chaque coupe, l'aire de chaque hémisphère est mesurée grâce au logiciel Image J, permettant ainsi de calculer la taille de l'œdème (en %) sur chaque coupe grâce à la formule suivante : (volume hémisphère gauche [HG] – volume hémisphère droit [HD]) / volume hémisphère droit. L'aire de la lésion est également calculée en mm² sur Image J pour chaque coupe, cette aire est corrigée par l'œdème (= aire de lésion x (aire HD / aire HG)).

Les volumes en mm³ sont ensuite calculés à partir des aires de chaque coupe et de la distance les séparant (1mm) grâce à la formule suivante : [(Aire coupe 1 + Aire coupe 2) + (Aire coupe 2 + Aire coupe 3) + ... (Aire coupe n -1 + Aire coupe n)] x ½.

Ainsi le calcul du volume (en mm³) de l'HG et HD permette d'en déduire l'œdème total (en %). Les aires du volume de lésion corrigées par l'œdème permettent d'obtenir le volume total de lésion du cerveau (en mm³).

3.4.3) Thiols totaux sérologiques

Dans une plaque 96 puits, 12,5µL de sérum préalablement congelé est mélangé avec 237,5µL de tampon Tris à 1M (pH 7,5). L'absorbance (A₁) est mesurée puis 10µL de la solution de DNTB (Sigma, D8130) à 10mM dans le méthanol sont ajoutés. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance est à nouveau mesurée (A₂). La différence d'absorbance (A₁-A₂) permet de déterminer la concentration en groupement thiols avec la loi de Beer Lambert : $A = \epsilon \times l \times C$. Ou $\epsilon = 13\,600 \text{ mol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 412nm. Soit $C = A / \epsilon \times l$. Les résultats en mol.L⁻¹ sont convertis en µM.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

PREMIÈRE PARTIE : Caractérisation et fonctionnalisation des NPC

Les caractéristiques des NPC déterminées dans cette première partie de la thèse concernent leur concentration en cérium, leur potentiel zêta et leur taille. Dans la partie suivante du travail, les NPC ont été fonctionnalisées sur leurs amines soit par un fluorophore, soit par un peptide ciblant.

1) Caractérisation des NPC

1.1) Détermination de la concentration en cérium des suspensions de NPC

1.1.1) Protocole

Les concentrations exactes en cérium des suspensions de NPC préparées sont déterminées par spectrométrie UV-visible selon la procédure précédemment décrite (Matériel et méthodes 1.3.1). L'absorbance des suspensions de NPC diluées au 1/100^{ème} dans du PBS a été mesurée par un spectromètre UV-visible et leur concentration déterminée grâce à la loi de Beer-Lambert.

1.1.2) Résultats

Dans un premier temps, la relation entre le coefficient d'extinction massique et la longueur d'onde a été déterminée par nos partenaires à l'université Paris Diderot. La Figure 38.A montre un pic du coefficient d'extinction massique à 25 116 mL.g⁻¹.cm⁻¹ pour une longueur d'onde de 289nm. La Figure 38.B présente l'absorbance de chaque suspension de NPC (ICONS 30, 36 et 73) en fonction de la longueur d'onde. Les suspensions de NPC absorbent à partir de 400nm et leur absorbance atteint un plateau à partir de 320nm ; la longueur d'onde de 350nm a donc été choisie pour calculer les concentrations des suspensions de NPC. A cette longueur d'onde, la valeur d'absorbance est de 1,161 ; 1,148 et 0,985 UA respectivement pour les NPC ICONS 30, 36 et 73. De plus, le coefficient d'extinction massique à 350nm est de 5 847 mL.g⁻¹.cm⁻¹ (Figure 38.A).

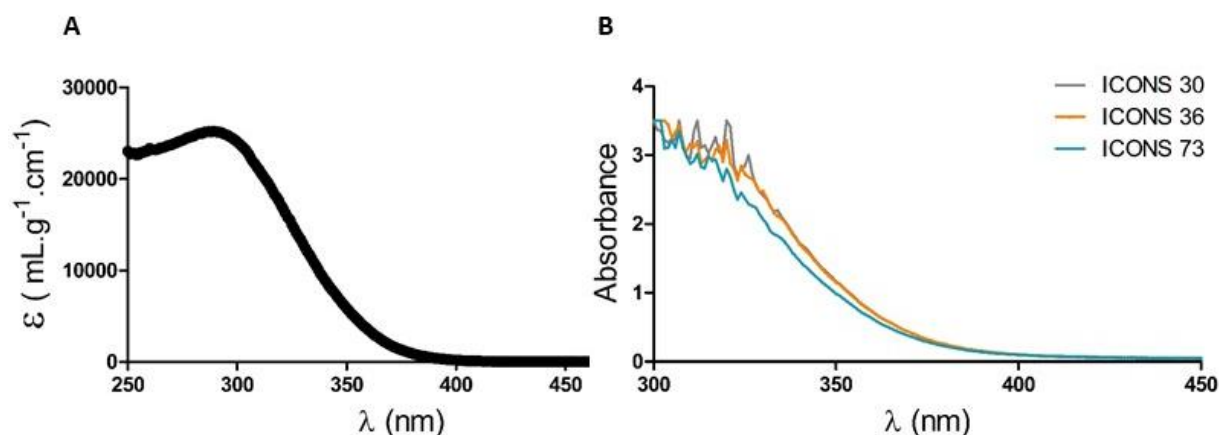


Figure 38 : Détermination de la concentration en cérium des suspensions de NPC.

Représentation du coefficient d'extinction massique en fonction de la longueur d'onde (A) et de l'absorbance des différentes suspensions de NPC (ICONS 30, 36 et 73) en fonction de la longueur d'onde (B).

La loi de Beer-Lambert permet de déterminer les concentrations des 3 suspensions de NPC : 0,199mg/mL, 0,196mg/mL et 0,168mg/mL respectivement pour les NPC ICONS 30, 36 et 73. Les suspensions de NPC ayant été diluées au 1/100^{ème}, les concentrations initiales des 3 suspensions sont respectivement de 19,9mg/mL, 19,6mg/mL et 16,8mg/mL pour les NPC ICONS 30, 36 et 73.

1.1.3) Discussion

Les concentrations en cérium mesurées, proches de 2% (20mg/mL), correspondent bien à celles attendues après nos étapes de préparation (Matériel et méthodes 1.2).

1.2) Potentiel zêta des NPC

1.2.1) Protocole

Le potentiel zêta des différentes suspensions aqueuses de NPC diluées au 1/100^{ème} dans du tampon acétate 0,1M à pH=4 est mesuré à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Matériel et méthodes 1.3.2).

1.2.2) Résultats

Les NPC nues ont un potentiel zêta de + 21mV tandis que les NPC pegylées ICONS 30, 36 et 73 ont un potentiel zêta respectivement de + 1,4 mV ; - 1,1 mV et + 5,8 mV.

1.2.3) Discussion

Nos résultats montrent que les NPC nues sont cationiques et que le recouvrement par les PEG masque la charge des NPC puisqu'une fois recouvertes les particules présentent un potentiel zêta proche de zéro. Ces données semblent cohérentes, la charge positive provenant des ions cérium et l'ajout de PEG globalement neutre masquerait la charge des NPC. Cependant, ces résultats sont en désaccord avec ceux de la littérature. Une étude a en effet montré que les NPC nues ont un potentiel zêta proche de zéro qui devient anionique (-30mV) après recouvrement des NPC par du 3-sulfopropylmethacrylate et inversement, cationique (+30mV) après recouvrement par du 2-(méthacryloyloxy)ethyl-triméthylammonium chloride ; Qiu et al., 2015). Une autre étude a rapporté un potentiel zêta cationique (+25mV) des NPC pegylées (Bao et al., 2018). Le recouvrement des NPC par des polymères fonctionnalisés par des fonctions amines (polyéthylène imine) a également produit à des NPC chargées positivement (+43,5mV ; Lee et al., 2013). Concernant les NPC nues, la charge dépend notamment de la méthode de synthèse (Chen and Stephen Inbaraj., 2018).

Le potentiel zêta des NPC est un paramètre important à prendre en compte pour leur utilisation dans les systèmes biologiques (Celardo et al., 2011) ; il influe notamment sur la localisation et l'adsorption des nanoparticules (Asati et al., 2010; Vincent et al., 2009). Une étude comparant trois recouvrements de charges différentes (cationique, anionique ou neutre) a montré que le recouvrement cationique provoquait une meilleure internalisation des NPC dans différents types cellulaires (HEK, H9c2, A549 et MCF-7). Il sera donc intéressant de mettre en parallèle nos valeurs de potentiel zêta et l'internalisation de nos NPC *in vitro*.

1.3) Taille des NPC

1.3.1) Protocole

La taille des nanoparticules a été mesurée par deux méthodes : la microscopie électronique pour mesurer le diamètre des NPC nues et la DLS pour mesurer le diamètre hydrodynamique des NPC

recouvertes (l'agrégation des NPC nues empêche les mesures par DLS). La DLS renseigne également l'indice de polydispersité (IP) ; plus celui-ci est élevé, plus la taille des NPC est hétérogène (Matériel et méthodes 1.3.3).

1.3.2) Résultats

L'image obtenue par microscopie électronique montre la présence de NPC agglomérées par groupe de 3 à 10 NPC dont le diamètre individuel reste néanmoins quantifiable (Figure 39. A). La distribution en fonction du diamètre des 200 NPC analysées est représentée sur la Figure 39.B ; les NPC nues ont un diamètre de $7,8 \pm 0,17$ nm (Figure 39.B).

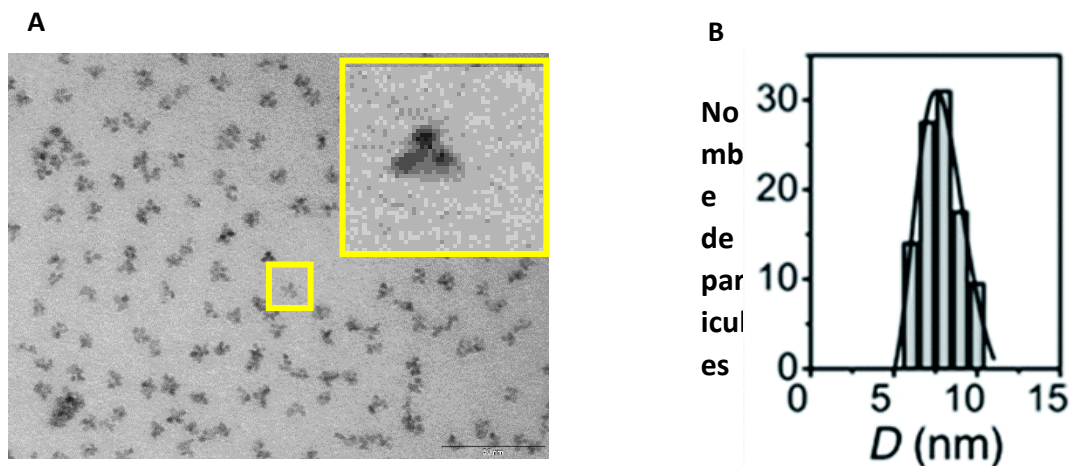


Figure 39 : Taille des nanoparticules d'oxyde de cérium par microscopie électronique.

(A) Image de microscopie électronique permettant de mesurer le diamètre du cœur de cérium des NPC. (B) Distribution des NPC en fonction de leur taille mesurée grâce au logiciel Image J.

Concernant les mesures de DLS, toutes les NPC en solution aqueuse ont un diamètre hydrodynamique compris entre 10 et 100 nm avec un pic aux alentours de 30 nm et un indice de polydispersité maximum de 0,22 pour les ICONS 30 à pH8 (Figure 40 A, B et C ; Tableau X).

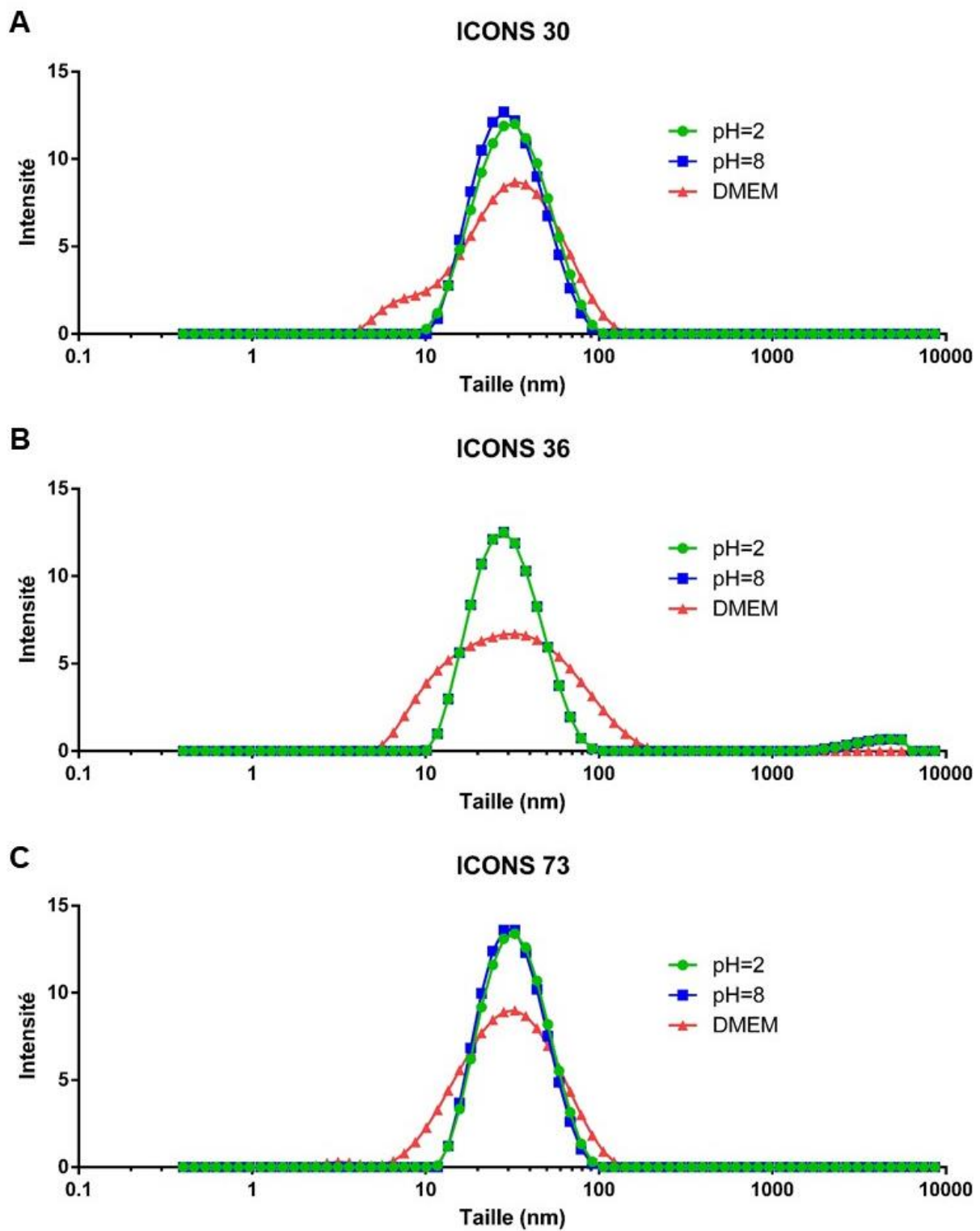


Figure 40 : Distribution des diamètres hydrodynamiques des NPC ICONS 30 (A), 36 (B) et 73 (C) mesurés par DLS.

Tableau X : Taille et indice de polydispersité (IP) des NPC ICONS 30, 36, 73 dans l'eau milliQ à pH 2 ou à pH 8 et dans le milieu de culture DMEM.

| | ICONS 30 | | ICONS 36 | | ICONS 73 | |
|-------------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|
| | Taille (nm) | IP | Taille (nm) | IP | Taille (nm) | IP |
| pH 2 | 28,4 | 0,156 | 28,0 | 0,211 | 29,9 | 0,141 |
| pH 8 | 27,8 | 0,169 | 28,1 | 0,220 | 29,2 | 0,144 |
| DMEM | 23,9 | 0,293 | 23,3 | 0,362 | 24,9 | 0,254 |

Dans le DMEM, le diamètre hydrodynamique des NPC est diminué d'environ 15% par rapport à celui observé dans l'eau milliQ. De plus, l'IP des diamètres hydrodynamiques des NPC dans le DMEM est plus élevé que ceux observés en solution aqueuse. Au vu de ces résultats, des mesures de DLS ont été effectuées sur le DMEM seul. Les diamètres hydrodynamiques des éléments présents dans le DMEM présentent une taille moyenne de 14,1nm et un IP de 0,352 (Figure 41).

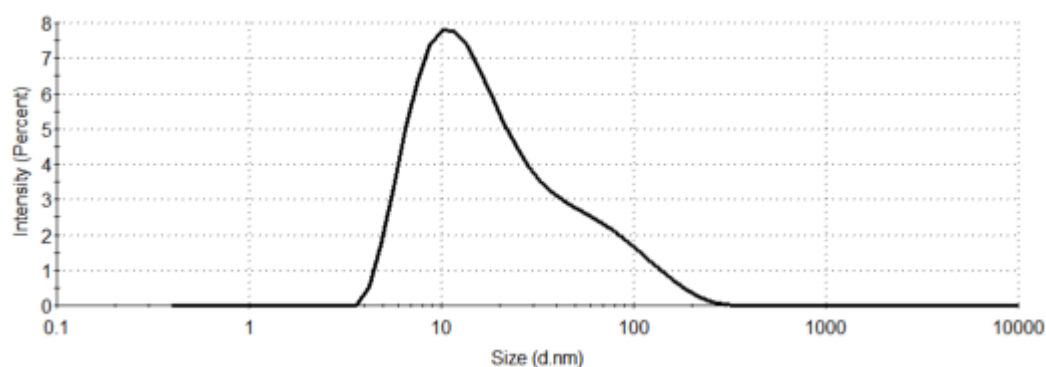


Figure 41 : Distribution des diamètres hydrodynamiques des éléments présents dans le DMEM.

1.3.3) Discussion

Le diamètre des NPC nues ($7,8 \text{ nm} \pm 0,17 \text{ nm}$) mesuré dans notre étude est en accord avec la valeur de 8 nm renseignée par le fournisseur Rhodia et avec celle rapportée dans d'autres études pour la même référence (Baldim et al., 2018; Ould-Moussa et al., 2013).

Le diamètre hydrodynamique de l'ordre de 30 nm après le greffage des PEG 1 kDa et/ou 2 kDa est également cohérent avec les données de la littérature : 28 nm avec un PEG 1kDa (Bao et al., 2018), 33,4 nm avec des PEG de 0,2 kDa (Cimini et al., 2012) et 40-50 nm avec un PEG 8 kDa (Arya et al., 2016). Kim et coll. ont utilisé comme nous des PEG de 2 kDa pour recouvrir leurs NPC, et ont obtenu des NPC de 17-18 nm donc plus petites que les nôtres ; cependant, leurs NPC nues avaient à la base un diamètre plus petit (3 à 5 nm ; Kim et al., 2012).

Par ailleurs, l'absence d'augmentation significative du diamètre hydrodynamique des NPC après basification de la suspension à pH 8 suggère un recouvrement efficace par les PEG qui ont permis de prévenir leur agrégation.

L'indice de polydispersité (IP) est utilisé pour décrire le degré de non-uniformité d'une distribution de tailles de particules. Ainsi, les valeurs inférieures à 0,050 correspondent à des NPC hautement monodisperses et les valeurs supérieures à 0,700 indiquent que l'échantillon présente une distribution très large de taille de particules (Danaei et al., 2018). A titre de comparaison, pour les liposomes utilisés en thérapeutique, un IP inférieur à 0,3 est considéré comme acceptable et indique une population homogène (Badran et al., 2014; FDA Novel Drug Approvals for 2018; Putri et al., 2017). L'IP étant inférieur à 0,3 pour toutes nos suspensions aqueuses à pH=2 et à pH=8, il permet de souligner l'homogénéité de la taille de nos NPC.

Dans le DMEM, le diamètre hydrodynamique de nos NPC apparaît diminué comparé aux valeurs mesurées dans l'eau milliQ. Ceci peut s'expliquer par les valeurs propres du DMEM dont les différents éléments (molécules [$\approx 1 \text{ nm}$], protéines [$\approx 10 \text{ nm}$] et agglomérats protéiques [$\approx 100 \text{ nm}$] présentent un diamètre hydrodynamique de 14 nm, plus faible que celui des NPC ; l'addition de DMEM aux NPC diminue donc le diamètre hydrodynamique de la solution. De même, la large distribution des diamètres hydrodynamiques des éléments du DMEM de 4 à 250 nm (avec un IP élevé) est à l'origine d'une augmentation de l'IP observé pour les NPC dans ce milieu.

D'autres caractérisations des NPC ont été réalisées par nos collaborateurs à l'université Paris Diderot. Le pourcentage d'ion Ce^{3+} et Ce^{4+} des NPC est déterminé par spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS) : les NPC contiennent 14% d'ion Ce^{3+} (données non présentées). La diffusion de rayons X à grand angle WAKS (Wide-angle X-ray scattering) permet de déterminer la forme et la structure

des NPC qui ont une structure cubique à faces centrées semblable à la fluorite (données non présentées).

2) Fonctionnalisation des NPC

Les PEG recouvrant les NPC ICONS 36 et 73 portent des fonctions amines à leur extrémité, permettant de réaliser différentes fonctionnalisations de ces nanoparticules telles que le greffage d'un fluorophore (cyanine 5) ou d'un peptide ciblant l'endothélium. Avant de réaliser ces greffages, il est nécessaire de déterminer la concentration d'amines des NPC afin d'ajuster la quantité de cyanine 5 ou de peptide à mettre en présence des NPC pour obtenir un greffage optimal.

2.1) Dosage des fonctions amines

2.1.1) Protocole

La gamme étalon de glycine (de 1 μM à 1 mM) et les NPC (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sont déposées dans une plaque 96 puits, 50 μl d'une solution de fluorescamine (3 mg/mL) sont déposés dans chaque puits et l'intensité de fluorescence (liée à la fixation de fluorescamine sur les amines primaires) est mesurée (Matériel et méthodes 1.3.4).

2.1.2) Résultats

L'équation de la droite obtenue pour la gamme étalon de glycine (Figure 42.A) permet de déterminer la concentration en amine primaire des NPC qui est de 28 μM pour les NPC ICONS 36 et de 110 μM pour les NPC ICONS 73 (Figure 42.B).

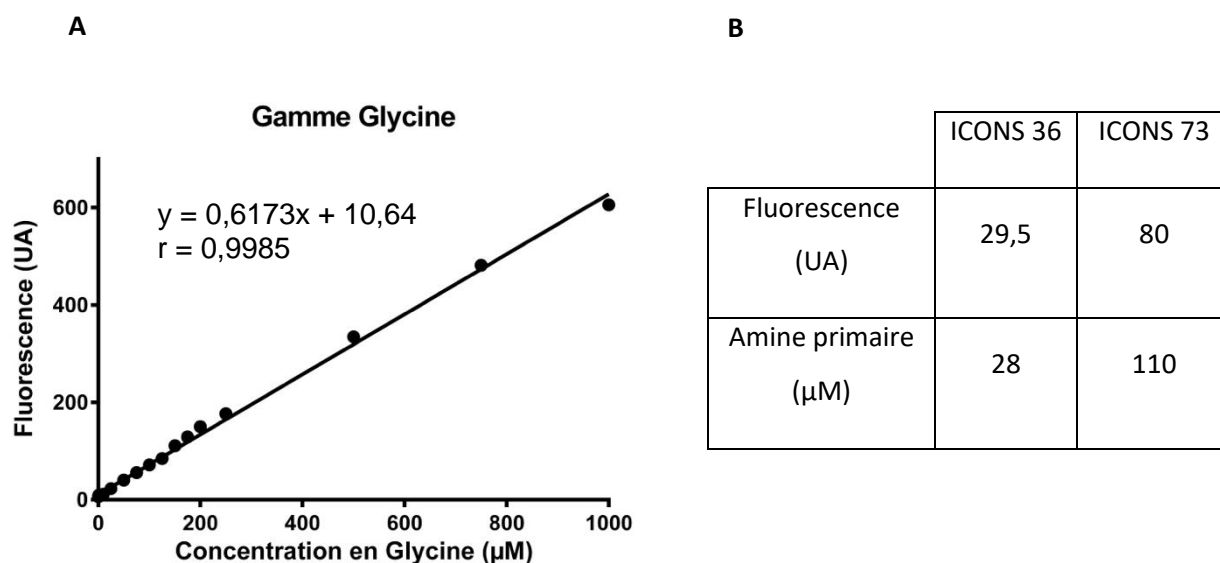


Figure 42 : Détermination de la concentration en amine des NPC ICONS 36 et ICONS 73. Gamme étalon de glycine (A) et concentration en amines des NPC (B).

2.1.3) Discussion

Les PEG des NPC ICONS 73 ont été synthétisés par Specific Polymers ultérieurement à ceux présents sur les ICONS 36. Le nombre de fonctions amines de ces PEG a été augmenté afin de fixer sur les NPC ICONS 73 une quantité plus importante de peptide et améliorer ainsi le ciblage sur les cellules endothéliales. Lors de la synthèse des PEG, Specific Polymers a mesuré par RMN – proton (résonance magnétique nucléaire) une concentration d’amines 2 fois plus importante dans les PEG des NPC ICONS 73 par rapport aux PEG des NPC ICONS 36. Après greffage de ces PEG sur les NPC et avec notre technique utilisant la fluorescamine, la concentration d’amines est 4 fois supérieure pour les ICONS 73 par rapport aux ICONS 36. Deux hypothèses pourraient expliquer ce facteur 2 entre nos mesures et celles de Specific Polymers : 1) une accessibilité moindre de la fluorescamine sur les ICONS 36 : en effet, les ICONS 36 possèdent des PEG de 2 kDa non aminés alors que les PEG aminés ne font qu’1 kDa, les PEG de 2 kDa pourraient donc recouvrir certaines fonctions amines et ainsi empêcher la fluorescamine de s’y fixer provoquant ainsi une diminution du signal et 2) un meilleur rendement de fixation des PEG sur les NPC ICONS 73.

2.2) Greffage de la cyanine

2.2.1) Principe et Protocole de vérification du greffage

Afin de détecter les NPC ICONS 36 et 73 par fluorescence, la cyanine5-NHS-ester est directement greffée sur les fonctions amines des PEG de ces NPC. La cyanine est ajoutée à 0,05 – 0,1 – 0,5 ou 1 équivalent (1 équivalent correspondant à 1 mole de cyanine 5 pour une mole de fonction amine) dans la suspension de NPC (28 μ M et 110 μ M de fonction amine respectivement pour les NPC ICONS 36 et 73 à 200 μ g/mL). Les NPC et la cyanine sont incubées pendant 2 heures à température ambiante sous agitation (Matériel et méthodes 1.4.1).

Les solutions sont ensuite passées sur des colonnes d'exclusion de 30 kDa : les NPC (\approx 250 kDa) sont retenues dans le « surnageant » alors que la cyanine libre (\approx 1 kDa) est retrouvée dans « l'éluat ». Plusieurs lavages sont réalisés par du PBS et la fluorescence est mesurée dans le surnageant et l'éluat après chacun d'eux (Figure 43 et 44), jusqu'à ce que la quantité de fluorescence dans l'éluat soit négligeable. La quantité de fluorescence est déterminée à partir d'une gamme de cyanine (Figure 29 – Matériel et méthodes 1.4.1 – greffage de la cyanine). Le rendement du greffage de cyanine 5 est alors calculé. Les NPC ICONS 30 sont traitées de la même façon que les NPC ICONS 36 et utilisées comme contrôle négatif (puisqu'elle ne possède pas de fonction amine sur leurs PEG).

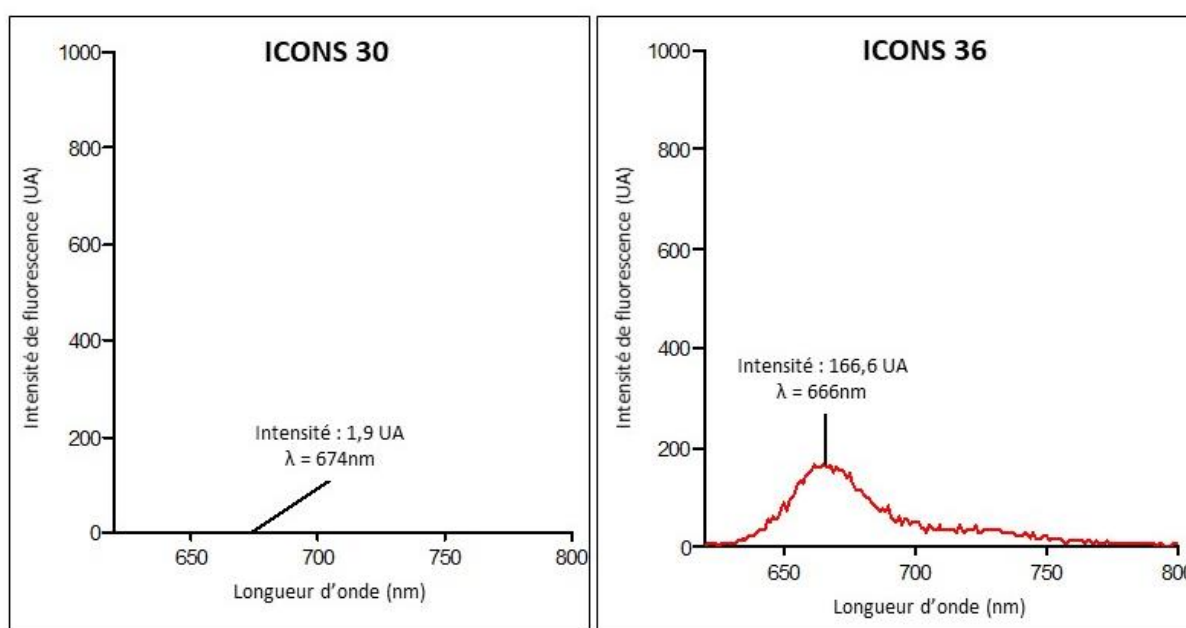


Figure 43 : Mesure de la fluorescence dans le surnageant après le dernier lavage des ICONS 30 et 36. Présence d'un pic de fluorescence spécifique à $\lambda = 665$ nm.

2.2.2) Résultats

A titre d'exemple, les résultats détaillés sont présentés pour 1 équivalent de cyanine.

La quantité de cyanine ajoutée aux NPC est déterminée à partir du dosage des fonctions amines des NPC ICONS 36 et 73 (Tableau XI).

Tableau XI : Détermination de la quantité de cyanine à 1 équivalent.

| Cyanine | ICONS 30 | ICONS 36 | ICONS 73 |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| Concentration d'amine (μM) pour les NPC à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 0 | 28 | 110 |
| Quantité d'amine (μmol) pour 1mg de NPC | 0 | 0,14 | 0,55 |
| Quantité de cyanine (μg) (MM = 778g/mol) | 0 | 108 | 428 |

Lors de ce greffage à 1 équivalent, 108 μg de cyanine ont donc été ajoutés aux NPC ICONS 30 et 36 et 428 μg aux ICONS 73 (Tableau XI).

La Figure 44 présente les mesures de fluorescence obtenues après greffage des NPC ICONS 30, 36 et 73. Avant le premier lavage, la quantité de cyanine retrouvée dans le milieu réactionnel est de 128 μg pour les ICONS 30, de 140 μg pour les ICONS 36 et de 226 μg pour les ICONS 73 (Figure 44.A). Pour les ICONS 30, la quantité de cyanine dans le surnageant diminue rapidement pour atteindre un niveau négligeable dès le 2^{ème} lavage (1,6% de la quantité de départ) et quasiment nulle après le 4^{ème} lavage (0,8%). A l'inverse, pour les ICONS 36, 8 % de la cyanine est toujours présente dans le surnageant après le dernier lavage. Pour les ICONS 73, le taux de cyanine présente dans le surnageant est de 5 % dès le 2^{ème} lavage et reste stable jusqu'au 4^{ème} lavage.

Concernant les éluats, la quantité de cyanine élue est très importante lors du premier lavage (\approx 50%) pour toutes les NPC, et devient négligeable lors du dernier lavage ($<$ 1,2 % ; Figure 44.B).

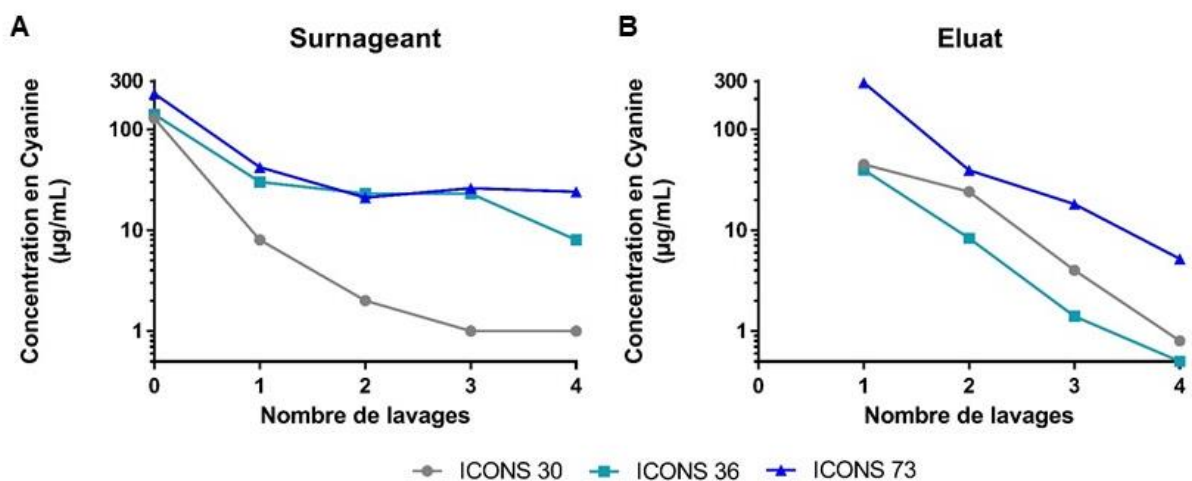


Figure 44 : Evolution de la concentration en cyanine dans les surnageants (A) et les éluats (B) après greffage de la cyanine 5.

Le tableau XX présente les données permettant de calculer le rendement du greffage obtenu avec 1 équivalent de cyanine, pour chaque particule (quantité de cyanine greffée/quantité de cyanine initialement ajoutée x 100). A la fin des 4 lavages, la quantité finale de cyanine 5 présente dans le surnageant est de 0 µg pour les ICONS 30, 8 µg pour les ICONS 36 et 24 µg pour les ICONS 73 ; le rendement de greffage de la cyanine sur les NPC est donc de : 0 % pour les ICONS 30, 7,5 % pour les ICONS 36 et 5,5 % pour les ICONS 73 (Tableau XII).

Tableau XII : Rendement du greffage de la cyanine pour les ICONS 30 et 36.

| Cyanine | ICONS 30 | ICONS 36 | ICONS 73 |
|----------------------------|----------|------------|------------|
| Quantité initiale (µg) | 108 | 108 | 428 |
| Quantité totale éluee (µg) | 74 | 50 | 352 |
| Quantité greffée (µg) | 0 | 8,1 | 23,5 |
| Rendement (%) | 0 | 7,5 | 5,5 |

Le Tableau XIII récapitule les rendements obtenus avec les différents équivalents testés. Pour les ICONS 36 et 73, les meilleurs résultats sont obtenus pour des concentrations équimolaires de cyanine et de fonctions amines.

Tableau XIII : Rendements des greffages réalisés en fonction du ratio cyanine / fonctions amines.

| Dates | Equivalent | Rendements (%) | | |
|---------|------------|----------------|----------|----------|
| | | ICONS 30 | ICONS 36 | ICONS 73 |
| mars-18 | 0,05 | 0 | 4,5 | 2,4 |
| | 0,10 | 0 | 7,2 | 2,1 |
| | 0,5 | 0 | 7,4 | 2,4 |
| | 1 | 0 | 7,5 | 5,5 |

La cyanine 5 a donc été utilisée à 1 équivalent pour la suite des fonctionnalisations. A chaque greffage de la cyanine réalisé dans ces conditions au cours du projet, les rendements ont été calculés ; leurs valeurs sont résumées dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Synthèse des rendements obtenus au cours des différents greffages de la cyanine.

| Dates | Rendements (%) | | |
|---------|----------------|----------|----------|
| | ICONS 30 | ICONS 36 | ICONS 73 |
| juin-18 | 0 | 9,9 | - |
| juil-18 | 0 | 50,0 | - |
| déc-18 | - | - | 11,1 |
| févr-19 | - | 38,3 | 17,4 |
| avr-19 | - | - | 33,0 |

2.2.3) Discussion

D'autres équipes ont également fonctionnalisé des NPC avec un fluorophore dont le FITC (Portioli et al., 2013; Qiu et al., 2015; Xia et al., 2008), la carboxyfluorescéine (Das et al., 2007; Hirst et al., 2013; Singh et al., 2010), le RITC (Bao et al., 2018) ou le DiR (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide ; cyanine proche infrarouge ; Gao et al., 2013), notamment pour étudier l'internalisation des NPC. Cependant, aucune de ces études n'a déterminé les rendements de greffage du fluorophore et peu d'informations sont disponibles sur les techniques de greffages. Deux techniques ont été utilisées pour récupérer les NPC fonctionnalisées par le fluorophore, soit par ultracentrifugation (Bao et al., 2018; Gao et al., 2013; Portioli et al., 2013; Xia et al., 2008) soit par précipitation de la carboxyfluorescéine par des lavages DMF (diméthylformamide), eau et acétone puis par centrifugation (Das et al., 2007; Hirst et al., 2013; Singh et al., 2010). De plus,

deux études ont également greffé leur fluorophore (FITC) directement sur des fonctions amines (Portioli et al., 2013; Xia et al., 2008).

La cyanine 5 a été sélectionnée car elle est excitée et émet dans le proche infrarouge ($\lambda_{\text{excitation}} = 640\text{nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 660\text{nm}$), ce qui lui confère deux principaux avantages : l'infrarouge interagit moins avec les constituants cellulaires ce qui permet de diminuer le bruit de fond et d'augmenter la sensibilité de détection ; de plus, le proche infrarouge est peu absorbé par les cellules, il a ainsi une capacité de pénétration plus élevée, notamment pour les études de biodistribution sur l'animal.

Les ICONS 30 ne contiennent pas de fonctions amines et la cyanine ne peut s'y greffer, ainsi les ICONS 30 servent de contrôle et permettent de déterminer le nombre de lavages nécessaires à l'élimination de la cyanine. A nombre de lavages identiques, une partie de la cyanine n'est pas éluee et toujours présente dans les surnageants pour les ICONS 36 et 73, suggérant ainsi la fixation de la cyanine à ces NPC et leur fonctionnalisation.

Le rendement pour les ICONS 73 (5,5 %) est plus faible que pour les ICONS 36 (7,5 %) ; cependant, la quantité de cyanine greffée est plus importante en valeur absolue pour les ICONS 73 (24 μg) par rapport aux ICONS 36 (8 μg) ce qui est en accord avec la présence de 4 fois plus de fonctions amines sur les NPC ICONS 73 que sur les NPC ICONS 36.

Bien que ces résultats soient cohérents dans leur ensemble, il faut néanmoins remarquer que, pour chaque NPC, la quantité de cyanine retrouvée dans le milieu réactionnel avant le premier lavage devrait être égale à la quantité théorique de cyanine 5 (108 μg pour les ICONS 30 et 36 et 428 μg pour les ICONS 73). Or, la valeur est légèrement supérieure pour les ICONS 30 : 128 μg (+ 19 %) et les ICONS 36 : 140 μg (+ 30 %) et très inférieure pour les ICONS 73 : 226 μg (- 47 %). De plus, la quantité initiale théorique de cyanine qui lui est ajoutée n'est pas retrouvée *in fine* dans le surnageant et la somme des éluats. Pour les ICONS 30, la somme des quantités de cyanine retrouvées dans les éluats est de 74 μg et elle est inférieure aux 108 μg ajoutés dans le milieu réactionnel. Pour les ICONS 36, 8 μg de cyanine sont retrouvés dans le surnageant après le dernier lavage et 50 μg dans tous les éluats : la somme des deux est inférieure aux 108 μg de cyanine ajoutés dans le milieu réactionnel. Idem pour les ICONS 73 où la quantité totale de cyanine retrouvée en fin d'expérience, 376 μg (352 μg dans les éluats et 24 μg dans le surnageant) est également inférieure à la quantité initiale (428 μg). Deux hypothèses peuvent être proposées :

- la cyanine pourrait être partiellement retenue par la colonne. Cependant la quantité de cyanine qui serait retenue (34 μg pour les ICONS 30, 54 μg pour les ICONS 36 et 52 μg pour les ICONS 73) semble importante et variable entre les ICONS 30 et 36 pour que cette seule hypothèse soit évoquée.

- Les limites liées à la mesure de fluorescence, notamment l'extinction de fluorescence (ou « quenching ») en cas de forte concentration en cyanine. Afin de limiter ce biais, les échantillons sont dilués afin que les valeurs de l'intensité de fluorescence soient comprises entre 10 et 300 (mesurable jusqu'à 1 000 en théorie). Ainsi, l'intensité de fluorescence des surnageants et des éluats a été mesurée après différentes dilutions, de 1/10^{ème} au 1/10 000^{ème} (Pour le milieu réactionnel des ICONS 73, très concentré en cyanine). Par exemple, pour les éluats, la dilution retenue après les premiers lavages est de 1/100^{ème} car la cyanine y est concentrée, puis au 1/10^{ème} et enfin sans dilution car la quantité de cyanine devient négligeable. Ce manque de reproductibilité dans les dilutions des échantillons mesurés, intrinsèque à ce dosage, pourrait expliquer ces incohérences entre la quantité théorique et les quantités totales mesurées.

Enfin, une variabilité importante est à noter dans les rendements de greffage de la cyanine 5. Plusieurs causes peuvent être évoquées telles que :

- **Le pH du milieu réactionnel** : Le pH du milieu réactionnel est ajusté entre 8 et 9 afin de déprotoner l'amine primaire et la rendre réactive vis-à-vis de la cyanine. Cependant, le pH est mesuré à l'aide de papier pH et non d'un pH-mètre (en raison du faible volume de milieu réactionnel), ce qui pourrait être à l'origine d'une variabilité du pH entre les différents greffages réalisés et ainsi affecter le rendement de la fonctionnalisation.
- **La conservation de la cyanine** (perte de fluorescence, dégradation de la fonction NHS-ester). Le premier lot de cyanine a été reçu en septembre 2017, il a été resuspendu, aliquoté, lyophilisé puis utilisé pour les expériences de mars à juin 2018 avec des rendements < 10% (ICONS 36 et 73). Le deuxième lot de cyanine, commandé en juillet 2018, n'a pas été lyophilisé et nous avons obtenu un rendement de 50% (ICONS 36). La lyophilisation du premier lot pourrait expliquer les faibles rendements, par un effet néfaste sur la liaison NHS – ester ou sur la fluorescence de la cyanine. Cependant pour le 3^{ème} lot, reçu en décembre 2018 et non lyophilisé, un rendement de 17% a été obtenu en février 2019 puis de 33% en avril 2019 (pour les ICONS 73). Ces données soulignent que la conservation de la cyanine pourrait affecter le rendement de greffage sans en être la seule cause.
- **Limite de la quantification par fluorescence**. De nombreux facteurs peuvent influencer la fluorescence dont l'extinction de fluorescence évoqué précédemment mais également la température, la pression, le pH, la concentration/agrégation, les ions (Brown et al., 2011). Tous ces paramètres n'ont pas été strictement contrôlés entre les différents greffages.

2.3) Greffage du peptide

2.3.1) Principe et Protocole

Un peptide a été synthétisé par GenePep afin de cibler l'endothélium vasculaire et d'y concentrer les effets antioxydants des NPC. Ce peptide a été synthétisé à partir d'une étude démontrant la spécificité de cette héptapeptide à se fixer sur VCAM-1 *in vitro* et *in vivo* (Burtea et al., 2009). Contrairement à la cyanine, ce peptide ne peut se lier directement aux fonctions amines des NPC et nécessite un agent « pontant » : le réactif de Traut (2-imminoéthiolane). Ce réactif se lie aux fonctions amines des NPC et possède une fonction thiol libre sur laquelle le peptide peut se greffer. Ainsi, le peptide est toujours greffé après la cyanine afin de transformer les fonctions amines non utilisées (par la cyanine) en fonctions thiols sur lesquelles le peptide va pouvoir se greffer (Matériel et méthodes 1.4.2).

Le réactif de Traut ($\approx 0,1$ kDa) est ajouté à 10 équivalents aux solutions de NPC (28 μM et 110 μM de fonctions amines respectivement pour les ICONS 36 et 73 à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), l'excès est éliminé par un passage sur colonne d'exclusion de 30 kDa puis le peptide est ajouté à 2 équivalents. Le même nombre de lavages effectués pour éliminer la cyanine libre est réalisé afin d'éliminer les peptides libres (non greffés).

Plusieurs techniques ont été testées afin de doser le peptide greffé sur les NPC :

- Le MALS / SEC (Multiangle light scattering / Size Exclusion Chromatography), qui permet d'obtenir la masse moléculaire des éléments (kDa) en fonction de la taille (par une colonne d'exclusion de taille). L'objectif était de démontrer une augmentation de la masse molaire des NPC après le greffage et de déterminer ainsi la quantité moyenne de peptide par NPC. Cependant, les colonnes testées ont toutes retenues les NPC.
- Le dosage de la fonction maliémide portée par le peptide. Le peptide porte une fonction maliémide qui peut être dosée indirectement dans les éluats (et non dans le surnageant car la fonction est dégradée en se fixant aux NPC) grâce à un kit (ab 112141, Abcam). La quantité de maliémide dans les éluats permet de déterminer la quantité de peptide greffé dans les surnageants. La fonction maliémide a tout d'abord été dosée sur le peptide seul et après passage du peptide seul sur la colonne (sans NPC). Lors de ces deux expériences préliminaires, la totalité du peptide était retrouvée. Par contre, la fonction maliémide n'était

pas dosable dans les éluats, même après leur concentration. Le peptide ayant été ajouté à 2 équivalents, même avec un rendement de 100%, 1 équivalent aurait dû être retrouvé dans les éluats.

Ainsi, ces deux techniques étant infructueuses, le dosage de l'ensemble des fonctions amines portées par le peptide (3 fonctions amine primaire) a été réalisé grâce à la fluorescamine. Le peptide ciblant l'endothélium (ou un peptide scramble) non fixé aux NPC a été dosé dans l'éluat ; en effet, le peptide ne peut être dosé dans le surnageant par cette technique en raison de la présence des NPC, elles aussi porteuses de fonctions amine. La quantité de peptide dans le surnageant (i.e. la quantité fixée sur les NPC) est ensuite obtenue par différence entre la quantité de peptide du milieu réactionnel et celle de l'éluat.

2.3.2) Résultats

Les courbes des gammes étalon de peptide ciblant et de peptide scramble montrant la relation entre fluorescence de la fluorescamine et concentrations de peptide ou de scramble sont présentées dans la partie matériel et méthodes (Figure 32 ; Matériel et méthodes 1.4.2).

Les NPC ICONS 36 et 73 utilisées ici ont préalablement été fonctionnalisées par la cyanine en mars 2018 comme présentés précédemment (rendements respectifs de 7,5 % et 5,5 %). Afin de déterminer l'équivalence optimale entre le peptide et les fonctions amines des NPC, différents équivalents ont été testés en mars 2018 (Tableau XV). Pour les ICONS 36 et 73, les meilleurs résultats sont obtenus pour 2 équivalents de peptide (ratio peptide : fonction amines 2 :1). Le rendement est respectivement de 80 % et 57 % pour les ICONS 36 et 73. Par conséquent, l'ajout de peptide à 2 équivalents a donc été retenu pour la suite des fonctionnalisations. Le rendement n'a pas pu être déterminé pour les ICONS 73 à ½ équivalent car la valeur dans l'éluat était en dessous de la limite de détection du peptide.

Tableau XV : Détermination de l'équivalence optimale en peptide ciblant par rapport aux fonctions amines des NPC.

| Equivalent | Rendement (%) | |
|---------------|---------------|----------|
| | ICONS 36 | ICONS 73 |
| 2 équivalents | 80 | 57 |
| 1 équivalent | 77 | 31 |
| ½ équivalent | 39 | - |

Lors de ce greffage, 160 µg de peptide ont été ajoutés aux NPC ICONS 36 et 628 µg aux ICONS 73 (Tableau XVI). La quantité de peptide ajoutée est déterminée par le dosage des fonctions amines des NPC ICONS 36 et 73 (Tableau XVI).

Tableau XVI : Détermination de la quantité de peptide à 2 équivalents.

| Peptide | ICONS 36 | ICONS 73 |
|--|------------|------------|
| Concentration d'amine (µM) pour les NPC à 200µg/mL | 28 | 110 |
| Quantité d'amine (µmol) pour 0,5mg* de NPC | 0,07 | 0,275 |
| Quantité de peptide (µg) à 1 équivalent (MM = 1 142g/mol) | 80 | 314 |
| Quantité de peptide (µg) à 2 équivalents | 160 | 628 |

* Un mg de NPC a été fonctionnalisé par la cyanine 5 (2.2.2 – Résultats du greffage de la cyanine). Ainsi 0,5 mg de 1 mg ont été fonctionnalisés par le peptide afin de conserver 0,5 mg de NPC – Cy5 comme contrôle.

A la fin des 4 lavages, la quantité finale obtenue est de 56 µg pour les ICONS 36 et 157 µg pour les ICONS 73, cela permet de calculer le rendement de greffage du peptide sur les NPC : 80 % pour les ICONS 36 et 57 % pour les ICONS 73 (Tableau XVII). Le rendement pour les ICONS 73 (57 %) est plus faible que pour les ICONS 36 (80 %).

Tableau XVII : Rendement du greffage du peptide à 2 équivalents pour les ICONS 30 et 36.

| Peptide | ICONS 36 | ICONS 73 |
|--|-----------|------------|
| Quantité de peptide greffable à 1 équivalent (nmol) | 70 | 275 |
| Quantité de peptide initial pour 2 équivalents (nmol) | 140 | 550 |
| Quantité de peptide dans les éluats (nmol) | 84 | 393 |
| Quantité de peptide dans le surnageant (Quantité initiale ajouté – quantité dans l'éluat) | 56 | 157 |
| Rendement de greffage (%) | 80 | 57 |

Par la suite, un greffage du peptide et du scramble a été réalisé sur les ICONS 36 après greffage de la cyanine dont le rendement était de 9,9% (Tableau XIV). Le rendement était de 81 % pour le peptide ciblant et de 66 % pour le peptide scramble (Tableau XVIII).

Tableau XVIII : Calcul des rendements de greffage du peptide ciblant (A) et du peptide scramble (B) à 2 équivalents.

| | PEPTIDE | SCRAMBLE |
|--|------------|------------|
| Fixation maximale théorique (pour 1,3mg de NPC) | 182 nmol | 182 nmol |
| Quantité éluee | 35nmol | 62 nmol |
| Quantité fixée | 147 nmol | 120 nmol |
| Rendement | 81% | 66% |

2.3.3) Discussion

Ces NPC fonctionnalisées par le peptide ciblant ont préalablement été greffées par la cyanine. Ainsi pour le premier greffage, 88 % des fonctions amines sont fonctionnalisées pour les ICONS 36 (7,9 % par la cyanine et 80 % par le peptide) et 63 % pour les ICONS 73 (5,5 % par la cyanine et 80 % par le peptide).

Lors du deuxième greffage des ICONS 36 par le peptide et le scramble, le rendement par la cyanine était de 9,9 %. Ainsi 91 % des fonctions amines étaient fonctionnalisées lors du greffage du peptide et 76 % lors du greffage du scramble.

Le greffage du peptide sur les ICONS 36 a été réalisé deux fois et les rendements obtenus sont similaires, respectivement de 80 et 81 %, soulignant la reproductibilité du greffage et des mesures effectuées, contrairement à ce que nous avons observé lors des différents greffages de la cyanine 5.

Le rendement de greffage du peptide ciblant/ scramble est nettement supérieur au rendement de greffage de la cyanine, cela pourrait être dû au réactif de Traut ou à la meilleure réactivité avec les fonctions thiols comparée aux fonctions amines.

Bien que les rendements soient plus faibles pour les ICONS 73, la quantité de peptide greffée est plus importante en valeur absolue pour ces NPC (157 µg) que pour les NPC ICONS 36 (56 µg) car les NPC ICONS 73 portent 4 fois plus de fonctions amine que les NPC ICONS 36.

D'autres équipes ont également fonctionnalisé leurs NPC (ou des NP) afin de les rendre ciblantes. Deux principales techniques sont utilisées dans la littérature : le couplage avec une molécule (Asati et al., 2009; Bao et al., 2018) ou l'utilisation d'un anticorps (Cimini et al., 2012; Yun et al., 2013). Par exemple, l'équipe de Asati a conjugué des NPC avec de l'acide folique afin de cibler les récepteurs folates des cellules cancéreuses (Asati et al., 2009). L'équipe de Bao a utilisé l'angiopep-2 afin de cibler les récepteurs LRP de la BHE et augmenter la transcytose (Bao et al., 2018). Une étude a greffé un anticorps anti-A β afin de cibler les plaques β -amyloïdes (Cimini et al., 2012).

Hormis les NPC, d'autres études ont fonctionnalisé des NP afin de réaliser des ciblage des récepteurs NMDA ou de VCAM-1, qui sont des cibles intéressantes dans notre étude. Une étude a ciblé les récepteurs NMDA par un anticorps NR1 (Yun et al., 2013), et une autre étude a réalisé un ciblage de VCAM-1 également par un anticorps (Gosk et al., 2008).

DEUXIÈME PARTIE : Étude de l'effet des NPC in vitro

Les études *in vitro* réalisées sur une lignée de cellules endothéliales cérébrales murines (bEnd.3) comportent quatre volets. Dans un premier temps, la toxicité des NPC a été recherchée sur des cellules en condition « physiologique » ; deux paramètres ont été étudiés : la mortalité cellulaire et l'activité métabolique. Dans un deuxième temps, l'activité antioxydante des NPC a été évaluée en « condition physiologique » puis en condition de stress oxydant. Puis, l'internalisation et la localisation subcellulaire des NPC ont été examinées par différentes techniques. Enfin, des études préliminaires ont été conduites pour mettre en évidence la spécificité des NPC ciblant.

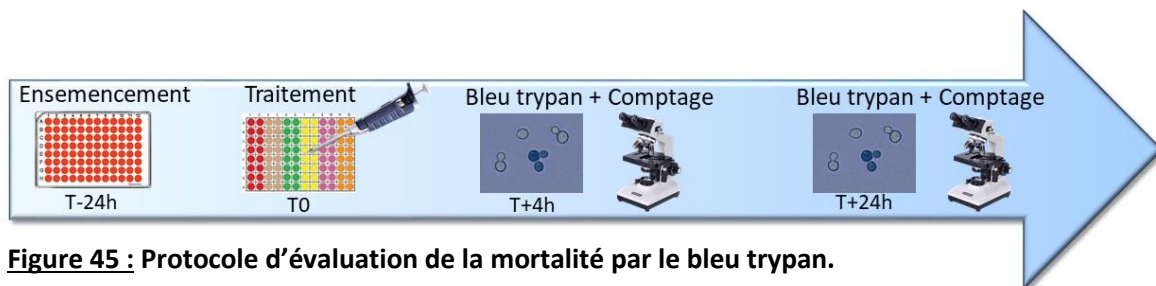
1) Études de toxicité

La toxicité des différentes NPC (ICONS nues, 30, 36 et 73) sur les cellules bEnd.3 a été étudiée aux concentrations de 10, 100 et 1000µg/mL pendant 4 heures ou 24 heures. Les effets de l'H₂O₂ (2mM) et de la N-Acétyl-Cystéine (NAC, 1mM), utilisés respectivement comme agents pro-oxydant et antioxydant de référence, ont également été examinés.

1.1) Mortalité cellulaire

1.1.1) Protocole

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 50 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées par du milieu DMEM (cellules contrôles), de l'H₂O₂ à 2mM (contrôle positif) ou les NPC ICONS nues, 30, 36 et 73 (10, 100 et 1000µg/mL) pendant 4h et 24h. Après les traitements, les cellules sont décollées des puits par la trypsine puis mises en présence du bleu trypan (Figure 45). Les cellules bleues (mortes) et blanches sont comptées afin de calculer le pourcentage de mortalité selon la formule: [Cellules bleues / (Cellules blanches + bleues)] x 100 (Matériel et méthodes 2.2.1).



1.1.2) Résultats

Après 4h de traitement, la mortalité des cellules contrôles est de $2,3 \pm 0,3\%$ et l' H_2O_2 2mM induit une augmentation significative de la mortalité cellulaire qui passe à $23,6 \pm 1,6\%$ ($P < 0,001$, Figure 46). Les NPC nues induisent une augmentation de la mortalité cellulaire significative uniquement à $1000\mu\text{g/mL}$: $28,7 \pm 9,6\%$ ($P < 0,001$, Figure 46). La mortalité des cellules traitées par les différentes NPC recouvertes (ICONS 30, 36 et 73) ne diffère pas significativement de celle des cellules contrôles (Figure 46). De plus, la mortalité cellulaire induite par les NPC nues à $1000\mu\text{g/mL}$ est diminuée significativement par la présence des différents recouvrements ICONS 30, 36 et 73 ($P < 0,01$ et $P < 0,001$ versus NPC nues ; Figure 46).

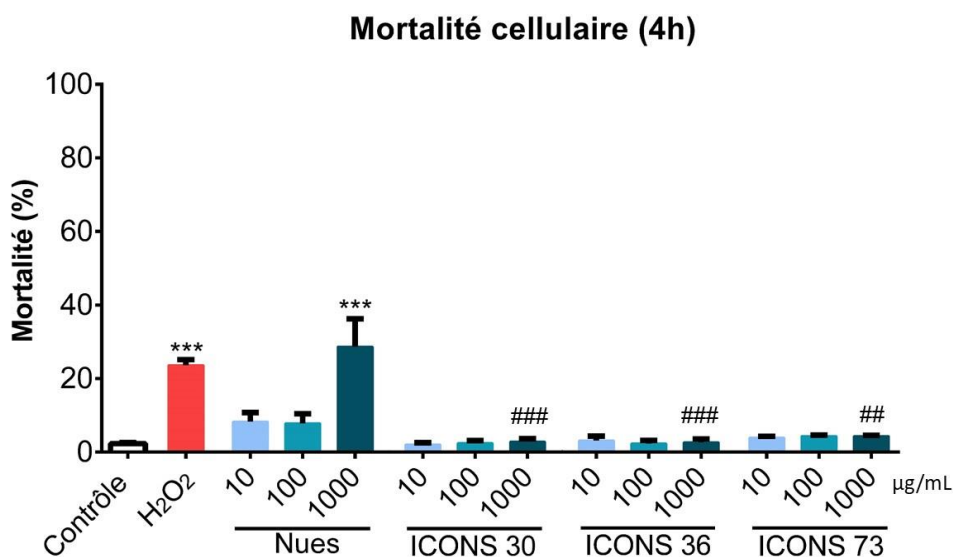


Figure 46 : Effet des différentes NPC sur la mortalité cellulaire après 4h.

Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM ($n=7$). ANOVA et test de Dunnett, *** $P < 0,001$ versus « Contrôle » et ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ versus « NPC ICONS nues à $1\ 000\mu\text{g/mL}$ ».

Après 24h, la mortalité des cellules contrôles reste faible : $3,3 \pm 0,4\%$ (Figure 47). A ce temps, l' H_2O_2 induit une augmentation significative de la mortalité cellulaire : $41,4 \pm 3,9\%$ ($P < 0,001$, Figure 47). Les nanoparticules nues augmentent significativement la mortalité à la concentration la plus forte de $1000\mu\text{g/mL}$: $35,4\% \pm 7,3\%$ ($P < 0,001$, Figure 47). La mortalité des cellules traitées par les différentes NPC recouvertes n'est pas significativement différente de celle des cellules contrôles (Figure 47). De plus, la mortalité cellulaire induite par les NPC nues à $1000\mu\text{g/mL}$ est diminuée significativement par la présence des différents recouvrements ICONS 30, 36 et 73 ($P < 0,001$, Figure 47).

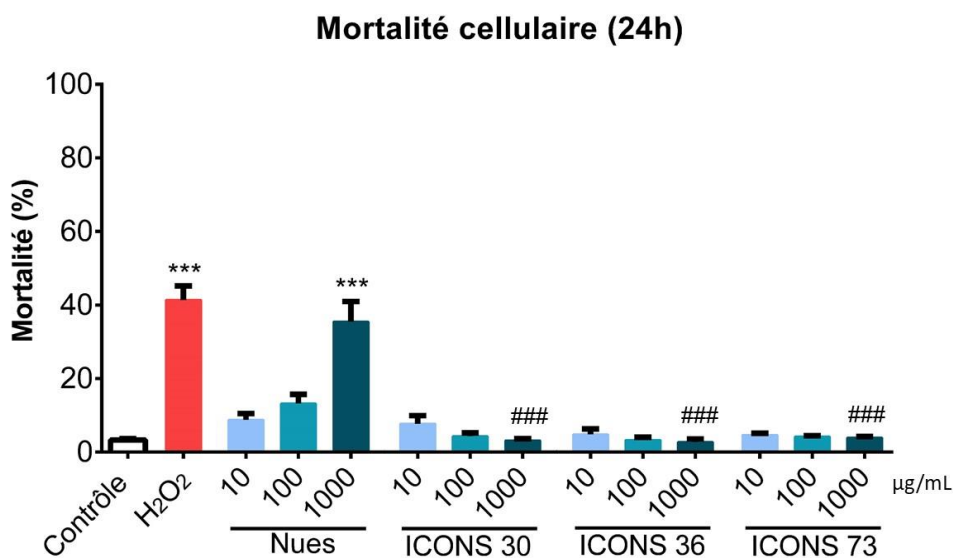


Figure 47 : Effet des différentes NPC sur la mortalité cellulaire après 24h.

Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM ($n=7$). ANOVA et test de Dunnett, *** $P < 0,001$ versus « Contrôle » et ### $P < 0,001$ versus « NPC ICONS nues à $1\ 000\mu\text{g/mL}$ ».

1.2) Activité métabolique

1.2.1) Protocole

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 50 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont été ensuite traitées par les NPC nues, ICONS 30, 36 et 73 ($10, 100$ et $1000\mu\text{g/mL}$) ou par l' H_2O_2 (2mM), utilisé comme contrôle positif. L'activité métabolique a été évaluée après 4h et 24h de traitement par le test au MTT (Figure 48). Les

résultats sont exprimés en pourcentage de densité optique de la condition contrôle (cellules bEnd.3 traitées par le milieu DMEM ; Matériel et méthodes 2.2.2).

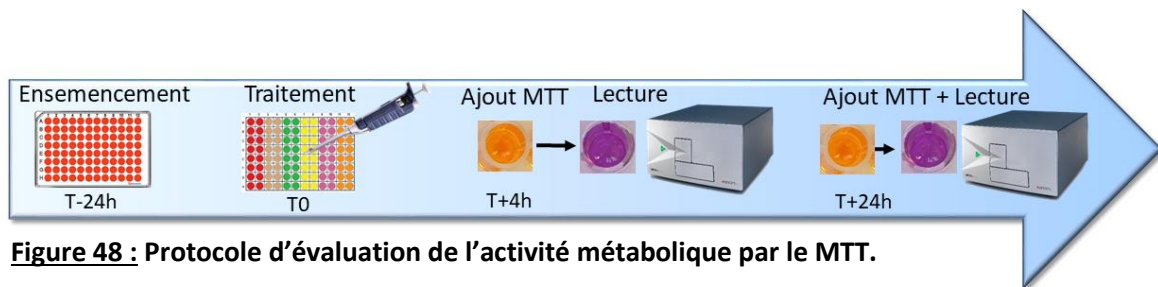


Figure 48 : Protocole d'évaluation de l'activité métabolique par le MTT.

1.2.2) Résultats

Après 4h de traitement, l'activité métabolique des cellules bEnd.3 est significativement diminuée de 54% en présence d'H₂O₂ (P < 0,001 ; Figure 49). L'activité métabolique n'est pas significativement modifiée par les NPC aux concentrations de 10 et 100µg/mL (Figure 49). En revanche, à la concentration de 1 000µg/mL, une baisse significative de l'activité métabolique des cellules bEnd.3 est observée avec les NPC ICONS 30 (25% ; P < 0,01) et avec les NPC ICONS 36 (26% ; P < 0,01 ; Figure 49).

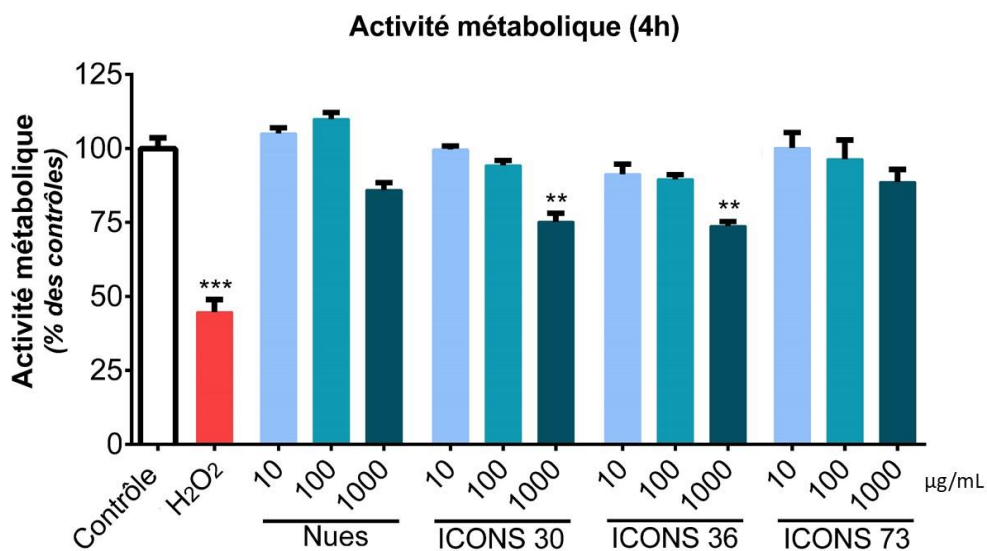


Figure 49 : Effet des différentes NPC sur l'activité métabolique après 4h de traitement.

Les données sont exprimées en moyenne ± ESM (n=5). ANOVA et test de Dunett, ** P < 0,01, *** P < 0,001 versus « contrôle ».

Après 24h de traitement, l'activité métabolique est significativement diminuée de 82% en présence d'H₂O₂ (P < 0,001, Figure 50). L'activité métabolique des cellules bEnd.3 n'est pas significativement modifiée par les NPC aux concentrations de 10 et 100µg/mL (Figure 50). En revanche, à la concentration de 1 000µg/mL, toutes les NPC entraînent une diminution significative de l'activité métabolique ; celle-ci est de 49% pour les NPC nues (P < 0,001), 22% pour les NPC ICONS 30 (P < 0,01), 35% pour les NPC ICONS 36 (P < 0,001) et 26% pour les NPC ICONS 73 (P < 0,001 ; Figure 50). A cette concentration, le recouvrement des NPC limite significativement la perturbation métabolique de 53 % pour les NPC ICONS 30 et de 45% pour les NPC ICONS 73 (P < 0,001 et P < 0,01 respectivement, *versus* NPC nues ; Figure 50). En revanche, l'effet est plus limité pour les ICONS 36 (+25%) et n'est pas significatif (Figure 50).

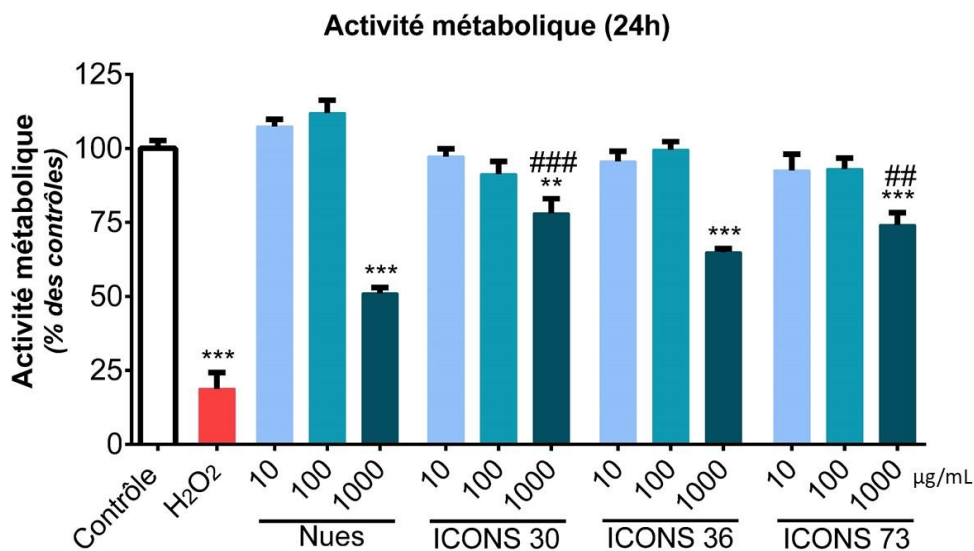


Figure 50 : Effet des différentes NPC sur l'activité métabolique après 24h de traitement.

Les données sont exprimées en moyenne ± ESM (n=5). ANOVA et test de Dunett, ** P < 0,01, *** P < 0,001 *versus* « contrôle » et ## P < 0,01, ### P < 0,001 *versus* « NPC ICONS nues à 1 000µg/mL ».

1.3) Discussion

Les cellules bEnd.3 ont été choisies car les NPC ICONS sont destinées à cibler l'endothélium vasculaire cérébral, afin d'y concentrer leurs effets antioxydants et de protéger les vaisseaux cérébraux de l'ischémie. De plus, les lignées cellulaires présentent intrinsèquement de nombreux avantages comparés aux cultures primaires pour des études préliminaires dont une prolifération

rapide et une variabilité moindre entre les cellules (meilleure pureté cellulaire, senescence plus faible).

L'H₂O₂, utilisé comme contrôle positif, augmente bien la mortalité cellulaire des cellules bEnd.3 et réduit également leur activité métabolique après 4h et 24h de traitement, validant ainsi notre modèle.

Concernant les études de mortalité, seules les NPC nues montrent une toxicité à la concentration la plus forte (1000µg/mL) ; cela pourrait être dû à leur agrégation et/ou à leur internalisation plus importante dans les cellules, selon la littérature, qui pourrait leur faire atteindre une concentration intracellulaire délétère (Alili et al., 2011, 2013; Karakoti et al., 2010; Lee et al., 2013b). Il est à noter que 1000µg/mL est une dose importante, la plupart des études *in vitro* utilise des doses plus faibles de NPC, comme présenté dans le tableau VII (Bao et al., 2018; Schubert et al., 2006).

Les NPC recouvertes quant à elles n'induisent aucune mortalité des cellules, quelles que soient la dose et la durée des traitements. Les différents recouvrements (ICONS 30, 36 et 73) limitent même significativement la toxicité induite par les NPC nues à 1000µg/mL. Ces données soulignent l'amélioration de la biocompatibilité induite par les recouvrements ICONS.

Concernant l'activité métabolique, cette expérience n'a démontré aucune perturbation de l'activité métabolique par toutes les NPC aux doses de 10 et 100µg/mL après 4h et 24h de traitements, soulignant la biocompatibilité de nos NPC aux concentrations communément testées dans la littérature. Une perturbation de l'activité métabolique n'a été observée que pour la forte concentration de NPC, de 14 à 26% selon les NPC après 4h de traitement, et de 22 à 49% après 24h. Comme pour la mortalité, le recouvrement des NPC par les ICONS 30 et 73 réduit significativement la perturbation de l'activité métabolique induite les NPC nues, soulignant leur intérêt.

Plusieurs études ont examiné *in vitro* la mortalité/viabilité induite par les NPC en condition « physiologique ». Une étude a utilisé, comme nous, la méthode du bleu trypan sur des progéniteurs cardiaques et observé une tendance à l'augmentation de la viabilité cellulaire à partir de 3 jours pour des doses de NPC recouvertes par du PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid) de 25 et 50µg/mL (Pagliari et al., 2012).

Bien qu'utilisé dans une autre étude après traitement par les NPC, le comptage au bleu trypan n'est pas la meilleure technique pour mesurer la mortalité induite par un traitement, notamment pour notre méthode, où le comptage a été réalisé manuellement. Le comptage manuel, à l'œil nu peut entraîner des biais en fonction de l'expérimentateur. Une alternative simple aurait été d'utiliser un compteur automatique qui permet, après insertion de la lamelle et mise au point, de compter

automatiquement les cellules blanches et bleues augmentant ainsi la répétabilité (Cellometer Auto 1000, ESBE Scientific, Markham, Ontario, Canada ; EVES-0500, MBI, Dorval, Canada). Une autre technique a été employée au début de l'étude : le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH), cette enzyme métabolique intracellulaire est dosée dans le surnageant, sa présence témoignant de la perte d'intégrité cellulaire. Cette technique a d'ailleurs été utilisée après traitement par des NPC (Horie et al., 2011). Cependant, le dosage de la LDH mesure la formation de NAD⁺ à $\lambda=340\text{nm}$ (la LDH catalyse le pyruvate en lactate utilisant comme cofacteur le NADH qui est converti en NAD⁺). Or, les NPC absorbent fortement dans les longueurs d'ondes inférieures à 400nm, comme évoqué précédemment. Ainsi les résultats obtenus étaient incohérents et fortement biaisés par la concentration de NPC.

D'autres techniques ont été utilisées dans la littérature dont des kits de comptage cellulaires : « *Live/Dead Assay Kit* » (Das et al., 2007) et « *CCK : Cell Counting Kit* » (Bao et al., 2018). Ces études ont démontré une diminution de la mortalité cellulaire à 10nM (1,7ng/mL) sur des cellules de moelle osseuse (Das et al., 2007) ou aucun effet sur la mortalité cellulaire de 3 à 100ppm (3 $\mu\text{g/mL}$ à 100 $\mu\text{g/mL}$) sur des cellules endothéliales cérébrales (Bao et al., 2018).

Des mesures de l'apoptose ont également été réalisées par cytométrie avec l'Annexine-V (Hirst, 2009 et Bao, 2018) et aucune augmentation de l'apoptose induite par les NPC n'a été démontrée sur des macrophages à des concentrations de 1nM à 10 μM (172pg/mL à 5,2 $\mu\text{g/mL}$; Hirst et al. 2009) ou sur des cellules endothéliales cérébrales de 3 à 100ppm (Bao et al., 2018).

Des études ont mesuré la prolifération cellulaire afin de quantifier la toxicité induite par les NPC (Arya et al., 2016; Xia et al., 2008). La première étude a utilisé l'iodure de propidium pour quantifier la viabilité cellulaire et n'a pas mis en évidence de toxicité des NPC à 25 $\mu\text{g/mL}$ sur des macrophages ou des cellules épithéliales bronchiques (Xia et al., 2008). La seconde étude a mesuré la prolifération cellulaire par le brDu (bromodésoxyuridine) et n'a observé aucune toxicité sur une culture primaire d'hippocampe isolée après injection de NPC à 5 $\mu\text{g/kg}$ (Arya et al., 2016). Enfin, une étude réalisée sur des kératinocytes et des cellules d'adénocarcinome n'a pas démontré de mortalité cellulaire induite (mesure de la lactate déshydrogénase) par les NPC à 100 et 200 $\mu\text{g/mL}$ sur les deux types cellulaires étudiés (Horie et al., 2011). L'ensemble de ces données obtenues sur de nombreux types cellulaires et par différentes techniques démontre la faible toxicité des NPC *in vitro*.

L'effet des NPC sur l'activité métabolique (évaluée par le test du MTT) a fait également l'objet de plusieurs études (Arya et al., 2014; Chen et al., 2013; Ghaznavi et al., 2015; Horie et al., 2011; Schubert et al., 2006; Tarnuzzer et al., 2005). La première étude n'a démontré aucune toxicité jusqu'à 10 000nM (1,72 $\mu\text{g/mL}$) sur des cellules mammaires saines, en revanche les NPC ont induit

une toxicité à partir de 100mM (17,2mg/mL) sur des cellules mammaires tumorales (Tarnuzzer et al., 2005). La seconde étude n'a mis en évidence aucune toxicité des NPC sur des macrophages et des neurones hippocampiques pour des concentrations allant de 2ng/mL à 100µg/mL (Schubert et al., 2006). Une étude sur des cellules endothéliales a confirmé l'absence de toxicité des NPC à des concentrations de 5 à 40µg/mL (Chen et al., 2013). Enfin, deux études n'ont pas démontré de toxicité des NPC à 25nM (4,3ng/mL) sur une culture primaire de neurones corticaux (Arya et al., 2014) ou à 100nM (17,2mg/mL) sur des cellules de phéochromocytome (Ghaznavi et al., 2015). L'ensemble de ces données souligne également la faible perturbation de l'activité métabolique induite par les NPC sur de nombreux types cellulaires.

Cependant, trois études ont montré un impact des NPC sur l'activité métabolique : sur une lignée de cellules ovariennes à partir de 0,25mM (43µg/mL ; Kim et al. 2012), sur des macrophages à partir de 10µg/mL (Selvaraj, 2015), sur des kératinocytes et des adénocarcinomes à partir de 200µg/mL (Horie et al., 2011).

Ainsi l'étude de Horie et coll. avait comme nous, montré une absence de mortalité cellulaire (par mesure de la LDH) induite par les NPC à 200µg/mL (sur des kératinocytes et des adénocarcinomes) mais une diminution de l'activité métabolique dans les mêmes conditions (Horie et al., 2011).

2) Activité antioxydante des NPC

L'activité antioxydante des NPC a été recherchée par différentes expériences. Dans un premier temps, des études préliminaires ont déterminé les activités superoxyde dismutase et catalase des NPC en milieu acellulaire. Dans un deuxième temps, l'activité antioxydante des NPC a été recherchée *in vitro*, sur la lignée bEnd.3, d'une part en condition physiologique et d'autre part, dans un modèle de stress oxydant induit par le glutamate.

2.1) Etude préliminaire : Activité SOD et CAT-like des NPC

Avant de mesurer l'activité antioxydante des NPC sur un modèle cellulaire, les activités SOD- et CAT-like des NPC ont été vérifiées *ex vitro* en condition acellulaire. Ces expériences ont été réalisées par nos partenaires de l'Unité Matière et Systèmes complexes à l'Université Paris Diderot.

2.1.1) Principe et Protocole

L'activité SOD, définie comme le pourcentage de dismutation des anions superoxydes, a été mesurée selon le protocole du fournisseur du kit (Kit Superoxide Dismutase #19160-1KTF, Sigma Aldrich). Vingt microlitres de suspension de NPC (dans du tampon Tris-HCl pH=7,5) sont déposés dans une plaque 96 puits et les réactifs du kit sont ajoutés ; l'absorbance est mesurée à 450nm après 20minutes d'incubation à 37°C.

L'activité CAT, définie comme le pourcentage de décomposition de l'H₂O₂, est dosée par spectrofluorimétrie selon le protocole du fournisseur du kit Amplex® Red Catalase (Cat # A22180, Thermofisher). Vingt-cinq microlitres de suspension de NPC (dans du tampon Tris-HCl pH=7,5) sont déposés dans une plaque 96 puits et 25µL d'une solution d'H₂O₂ à 5µM et 50µL de réactif Amplex-red/ HRP sont ajoutés ; l'ensemble est incubé pendant 30 minutes à température ambiante puis la fluorescence est mesurée ($\lambda_{\text{excitation}}= 571\text{nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 585\text{nm}$).

2.1.2) Résultats

L'activité SOD des NPC nues augmente en fonction de leur concentration : elle est de 7,8% à 1µg/mL ; 45,5% à 10µg/mL ; 89,2% à 100µg/mL et 100% à 1000µg/mL (Figure 51 A, B). Le recouvrement des NPC ICONS 30 ne modifie pas l'activité SOD (Figure 51 A, B). En revanche, l'activité SOD semble légèrement diminuée par les ICONS 36 et les ICONS 73 (Figure 51 A, B). Concernant les NPC ICONS 36, la diminution de l'activité SOD induite par le recouvrement est de 32% à 1µg/mL, 17% à 10µg/mL et 4% à 100µg/mL (Figure 51 A, B). Pour les NPC ICONS 73, la diminution de l'activité SOD par rapport aux NPC nues est de 32% à 1µg/mL, 22% à 10µg/mL et 9% à 100µg/mL (Figure 51 A, B).

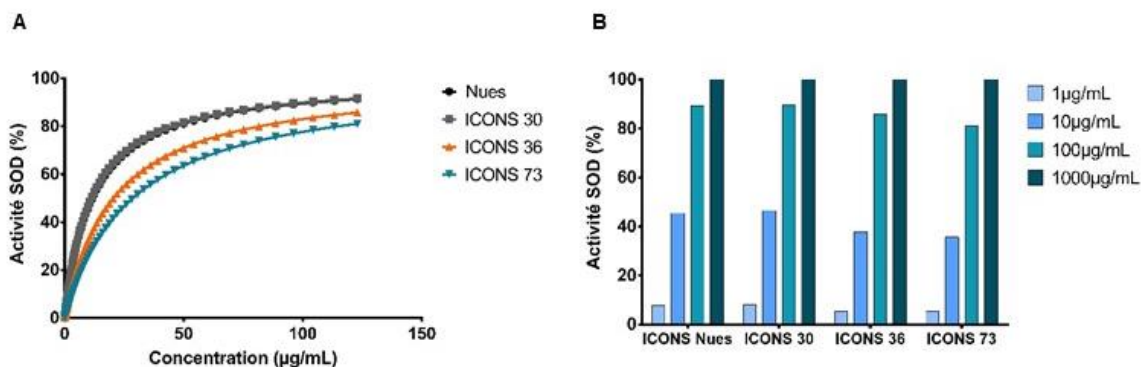


Figure 51 : Activité SOD-like des NPC nues et recouvertes.

Les données sont exprimées en % de dégradation de l'O₂^{•-} (Activité SOD). (A) Activité SOD (en %) en fonction de la concentration en NPC (µg/mL). (B) Activité SOD (en %) à 1, 10, 100, 1000µg/mL.

Les résultats montrent également une augmentation de l'activité CAT en fonction de la concentration des NPC nues (10,6% à 1µg/mL ; 54,3% à 10µg/mL ; 92,2% à 100µg/mL et 100% à 1000µg/mL ; Figure 52 C, D). L'activité CAT est légèrement diminuée par la présence des différents recouvrements et ce particulièrement aux concentrations les plus faibles (Figure 52 C, D). Ainsi, à 1 µg/mL la diminution de l'activité CAT est respectivement de 58%, 51% et 54% par les recouvrements ICONS 30, 36 et 73 (Figure 52 C, D). A 10 µg/mL, la diminution de l'activité CAT est respectivement de 42%, 35% et 38% par les recouvrements ICONS 30, 36 et 73 (Figure 52 C, D). Enfin, à 100 µg/mL la diminution de l'activité CAT par les recouvrements ICONS 30, 36 et 73 est respectivement de 11%, 8% et 9% (Figure XX A, B)

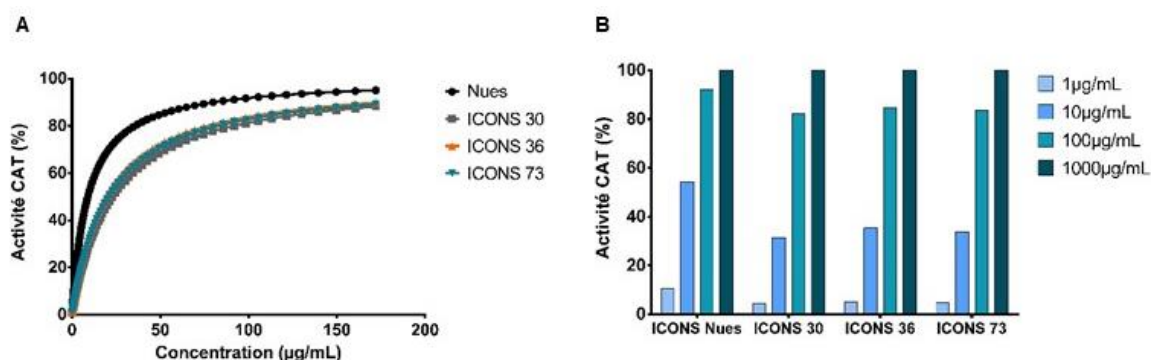


Figure 52 : Activité CAT- like des NPC nues et recouvertes.

Les données sont exprimées en % de dégradation de l'H₂O₂. (B) Activité CAT (en %) en fonction de la concentration en NPC (µg/mL). (B) Activité CAT (en %) à 1, 10, 100, 1000µg/mL.

2.1.3) Discussion

A même concentration, les activités CAT et SOD d'un type de NPC sont du même ordre ($\pm 10\%$). Pour rappel, la SOD dismute l'O₂• en H₂O₂ et l'H₂O₂ est pris en charge par la CAT qui le dégrade en H₂O. Si les NPC avaient une activité SOD plus importante que leur activité CAT, elles induiraient une augmentation de la production d'H₂O₂ pouvant être délétère par la suite pour la cellule. L'activité complémentaire SOD et CAT des NPC permet donc de réduire efficacement l'action potentiellement délétère des anions superoxydes.

Bien que les activités CAT et SOD soient du même ordre quelques différences ont été observées. Le recouvrement des NPC par les ICONS 36 ou 73 diminue l'activité SOD et CAT. Le recouvrement des NPC par l'ICONS 30 réduit uniquement l'activité CAT. Enfin, l'activité CAT est plus fortement réduite

par le recouvrement que l'activité SOD. La baisse plus importante de l'activité CAT induite par les recouvrements pourrait être problématique en provoquant une accumulation plus importante d'H₂O₂, mais les différences semblent être très limitées comme évoqués précédemment ($\pm 10\%$).

Plusieurs équipes ont mis en évidence l'activité SOD des NPC (Baldim et al., 2018; Clark et al., 2011; Heckert et al., 2008; Hosseini et al., 2015; Kim et al., 2012; Korsvik et al., 2007; Pirmohamed et al., 2010). La première de ces études a en outre montré qu'un recouvrement des NPC par l'EDTA n'altérerait pas leur activité SOD (Korsvik, 2007). Les mêmes auteurs et une autre étude ont rapporté également que l'activité SOD des NPC était fonction de leur taille et/ou de leur taux de Ce³⁺ (Korsvik et al., 2007; Pirmohamed et al., 2010); une étude récente réalisée par nos partenaires de l'Unité MSC a confirmé ces données (Baldim et al., 2018).

La première étude démontrant l'activité CAT des NPC est parue en 2010 (Pirmohamed et al., 2010). Cette étude suggère que des taux plus importants de Ce⁴⁺ favorisait l'activité CAT (Clark et al., 2011; Pirmohamed et al., 2010); l'étude réalisée par nos partenaires démontre quant à elle que l'activité CAT dépend uniquement du taux de Ce³⁺ et de la taille des NPC (Baldim et al., 2018).

2.2) Activités antioxydantes des NPC in vitro

Les capacités antioxydantes des NPC ont été étudiées *in vitro* sur les cellules bEnd.3 tout d'abord en condition « physiologique », puis en condition de stress oxydant.

2.2.1.) Effet antioxydant des NPC en condition physiologique

Pour évaluer l'activité antioxydante des NPC en condition physiologique, les concentrations d'ERO ont été mesurées à l'aide la sonde H₂DCF –DA (Matériel et méthodes 2.3.1.1).

2.2.1.1) Protocole

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 50 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules sont ensuite traitées par le DMEM (cellules contrôles), la N-Acétyl Cystéine (NAC), un antioxydant de référence, ou les NPC nues, ICONS 30, 36 et 73 à 10, 100 et 1000µg/mL. Après 4h ou 24h de traitement, la sonde H₂DCF-DA est

ajoutée une concentration de 20 μ M finale dans chaque puits durant 30 minutes (Figure 53). La production d'ERO est fixée à 100% pour les conditions respectives à T0.

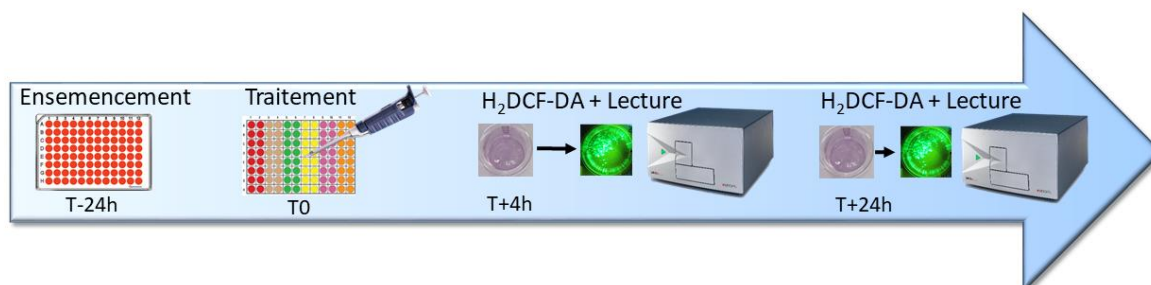


Figure 53 : Protocole de détection par l'H₂DCF-DA des ERO produits par les cellules bEnd.3.

2.2.1.2) Résultats

Dans un premier temps, l'effet d'une gamme de NAC (0,1; 1 et 10mM) a été testé sur la production d'ERO par les cellules durant 4h afin de déterminer la concentration optimale en NAC.

La production d'ERO des cellules « contrôles » augmente significativement à 3h ($P < 0,05$) et atteint $189 \pm 17\%$ à 4h ($P < 0,05$; Figure 54). La NAC ne modifie pas significativement cette production d'ERO à la concentration de 0,1 mM. En revanche, aux concentrations de 1 et 10 mM, la NAC réduit significativement la production d'ERO à partir de 2h de traitement. Après 4h de traitement, cette réduction est de $112 \pm 12\%$ ($P < 0,01$) et $102 \pm 5\%$ ($P < 0,001$) pour les concentrations de 1 et 10 mM respectivement.

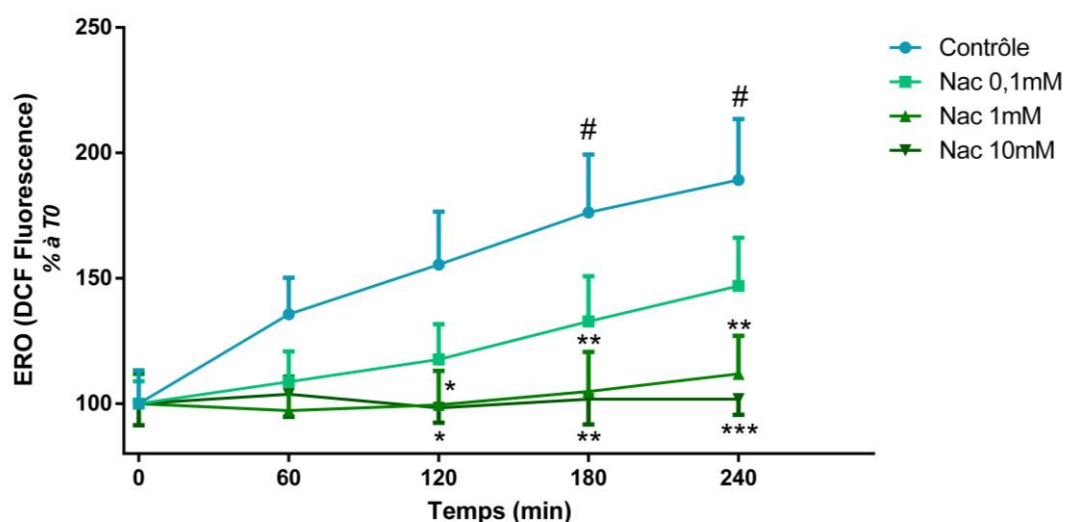


Figure 54 : Effet de la NAC sur la production des ERO.

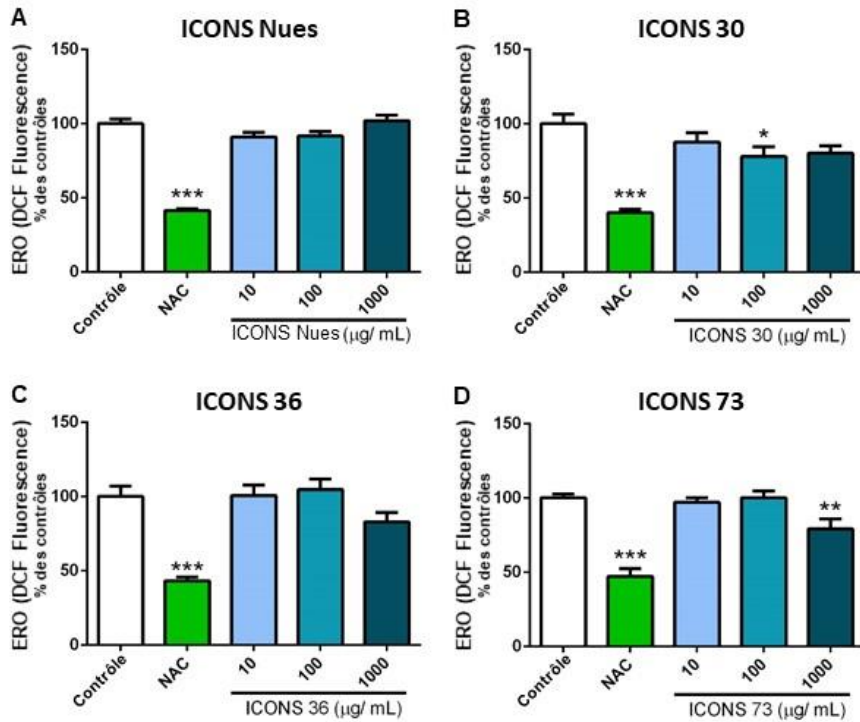
Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM ($n=5$). ANOVA + test de Dunett # $P < 0,05$ versus contrôle à $T=0$ min et ANOVA 2 facteurs + test de Dunett * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ versus contrôle au même temps.

Au vu de ces résultats, la concentration de 1 mM de NAC a été retenue pour les études ultérieures.

L'effet propre des NPC sur la production d'ERO, évalué après 4h et 24h de traitement, est présenté Figure 55. Dans cette étude, la NAC a à nouveau réduit significativement la production des ERO de 53 à 60% selon les études à 4h ($P < 0,001$) et de 47% ($P < 0,01$) à 56% ($P < 0,001$) à 24h.

Après 4h d'incubation, seules les NPC ICONS 30 à 100 μ g/mL et les NPC ICONS 73 à 1000 μ g/mL réduisent la production d'ERO intracellulaire, respectivement de 22% ($P < 0,05$) et de 21% ($P < 0,01$; Figure 55 B et D). Après 24h d'incubation, aucune des NPC ne réduit la production d'ERO (Figure 55 E-H).

4 Heures



24 Heures

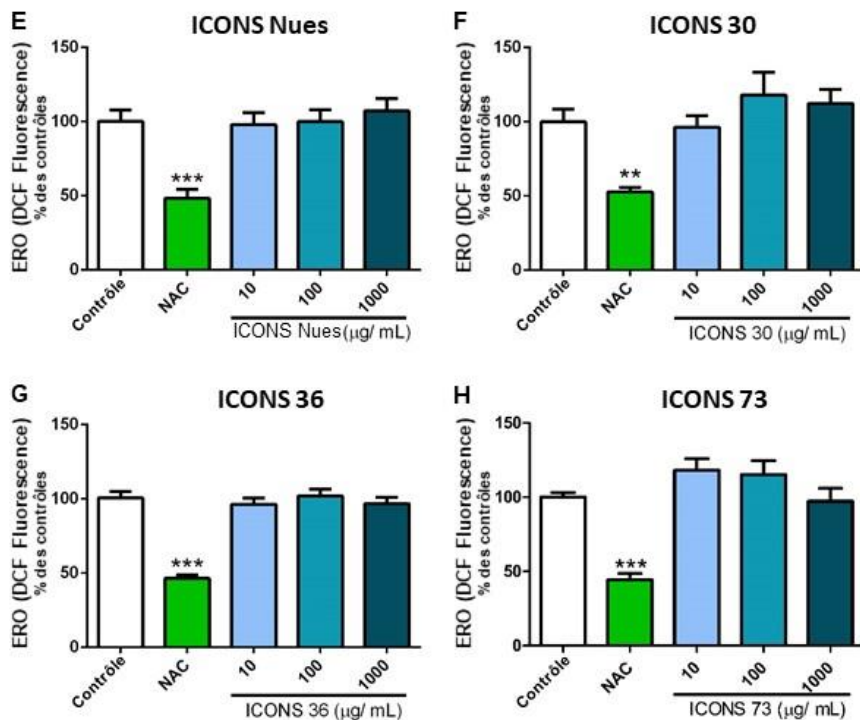


Figure 55 : Effet des différentes NPC sur la production des ERO après 4h (A-D) et 24h (E-H) de traitements. Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (n=8-16 à 4h et n=6-16 à 24h). ANOVA + test de Dunett, * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001 versus « contrôle ».

2.2.1.2) Discussion

La production d'ERO par les cellules contrôles augmente fortement au cours du temps. Cela peut être dû à la production physiologique d'ERO par les cellules ou à une autofluorescence de la sonde. Étant donné que la NAC à 1 et 10mM inhibe totalement la production d'ERO des cellules, l'augmentation du signal est bien liée à la production d'ERO plutôt qu'à l'autofluorescence de la sonde. L'effet antioxydant de la NAC retrouvé dans notre étude permet en outre de valider notre technique d'évaluation de la production des ERO. La concentration optimale de NAC retenue est de 1mM car elle suffit à s'opposer totalement à la production d'ERO qui survient dans les cellules contrôles au cours du temps. De plus, la NAC à 10mM ne démontre pas d'effet antioxydant plus important que la NAC à 1mM.

Concernant les NPC, aucune activité antioxydante n'a été observée après 4h et 24h de traitements (hormis les ICONS 30 à 100µg/mL et les ICONS 73 à 1000µg/mL après 4h de traitement). Paradoxalement, l'absence d'effet antioxydant en condition physiologique n'est pas une problématique. Comme évoqué dans l'introduction, les ERO produits en condition physiologique ont un rôle nécessaire au sein de la cellule, notamment dans la signalisation cellulaire.

Nos résultats sont en accord avec quelques études qui ont évalué le pouvoir antioxydant des NPC en condition physiologique avec l'H₂DCF-DA. Ainsi, une étude sur une culture primaire de neurone n'a pas mis en évidence de modification de la production physiologique d'ERO après traitement par des NPC de 7-10nm à 25mM (4,3ng/mL ; Arya et al., 2014). Le même groupe n'a pas démontré d'effet des NPC pegylées de 40nm sur la production d'ERO physiologique après injection des NPC à 5µg/kg à des rats (Arya et al., 2016). Enfin deux autres études ont confirmé l'absence de modification de la production d'ERO physiologique par les NPC : de 8nm à 10µg/mL sur des macrophages et sur des cellules épithéliales bronchiques (Xia et al., 2008) ou sur des progéniteurs cardiaques après traitement par des NPC de 5-8nm entre 10 et 50µg/mL (Pagliari et al., 2012).

Deux études ont cependant mis, elles, en évidence une activité antioxydante des NPC en condition physiologique : les macrophages voient leur production d'ERO diminuer de 25% après traitement par des NPC de 3-5nm à 10µM (1,72µg/mL ; Hirst et al., 2009) et de 40% après traitement par des NPC de 12nm à 20µg/mL (Schubert et al., 2006).

Enfin une étude a suggéré un rôle pro-oxydant des NPC en condition physiologique sur des cellules cancéreuses, avec une augmentation d'un facteur 2 de la production d'ERO après traitement par des NPC à 200µg/mL ; cependant, aucun effet n'a été démontré à une concentration de 100µg/mL (Horie et al., 2011).

2.2.2) Effet antioxydant des NPC en condition de stress

Notre modèle de stress oxydant a consisté à traiter les cellules bEnd.3 par le glutamate afin de mimer l'excitotoxicité qui se produit lors d'une ischémie cérébrale et qui est à l'origine d'une production d'ERO. Ce modèle a nécessité une étape de mise au point afin de fixer la concentration optimale de glutamate qui induit une production d'ERO sans entraîner de toxicité trop importante. L'effet des NPC a ensuite pu être testé.

2.2.2.1) Mise au point du modèle de stress oxydant

Dans un premier temps, une gamme de glutamate a été testée sur la production d'ERO au sein des cellules sur une cinétique de 4h. Afin de valider la concentration de glutamate choisie, l'effet de la NAC sur la production d'ERO induite par le glutamate a ensuite été étudié. Les études ont été répétées à 24h. Enfin, des études de toxicité ont été conduites.

2.2.1.1) Induction de la production d'ERO par le glutamate aux temps précoces

2.2.1.1.1) Principe et protocole

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 50 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées par le DMEM (« cellules contrôles ») ou par le glutamate à 2,5 ; 10 et 100mM pendant 4h. La sonde H₂DCF-DA est ajoutée à une concentration de 20µM finale dans chaque puits. La production d'ERO a été fixée à 100% pour les valeurs respectives à T0 (Matériel et méthodes 2.3.1.1).

2.2.1.1.2) Résultats

La production d'ERO par les cellules « contrôles » augmente au cours du temps : de 77% à 1h (P < 0,05), 124% à 2h (P < 0,001), 152% à 3h (P < 0,001) et 179% à 4h (P < 0,001 - Figure 56). Le glutamate à 2,5mM et 10 mM n'induit pas d'augmentation significative de la production d'ERO par rapport à celle des cellules « contrôles », quel que soit le temps (Figure 56). En revanche, à la concentration de 100mM, le glutamate induit une augmentation significative de la production d'ERO dès 60 minutes

de traitement : +43% après 1h ($P < 0,05$), +46% après 2h ($P < 0,01$) +47% après 3h ($P < 0,001$) et +48% après 4h de traitement ($P < 0,001$; Figure 56).

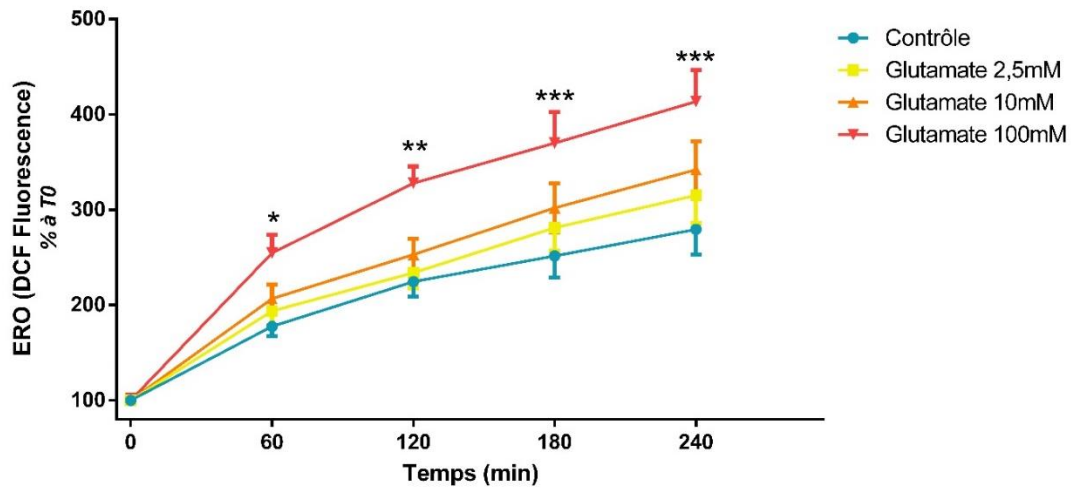


Figure 56 : Effet du glutamate sur la production d'ERO par les cellules bEnd.3.

Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM ($n=7$). Les valeurs sont fixées à 100% pour les valeurs respectives à T0. ANOVA 2 facteurs à mesures répétées + test de Dunnett * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ versus contrôle.

Au vu de ces résultats, la concentration de 100mM de glutamate a été retenue et l'effet de la NAC a été étudié. A nouveau, dans cette étude, la production d'ERO par les cellules « contrôles » augmente au cours du temps, jusqu'à $189 \pm 17\%$ à 4h (Figure 57) et le glutamate à 100mM induit une augmentation significative de la production d'ERO qui est de 87% à 4h ($P < 0,001$; Figure 57). L'addition de NAC (1mM) réduit significativement la production d'ERO induite par le glutamate quel que soit le temps étudié : de 100% à 1h ($P < 0,05$), 187% à 2h ($P < 0,001$), 208% à 3h ($P < 0,001$) et 227% à 4h ($P < 0,001$; Figure 57).

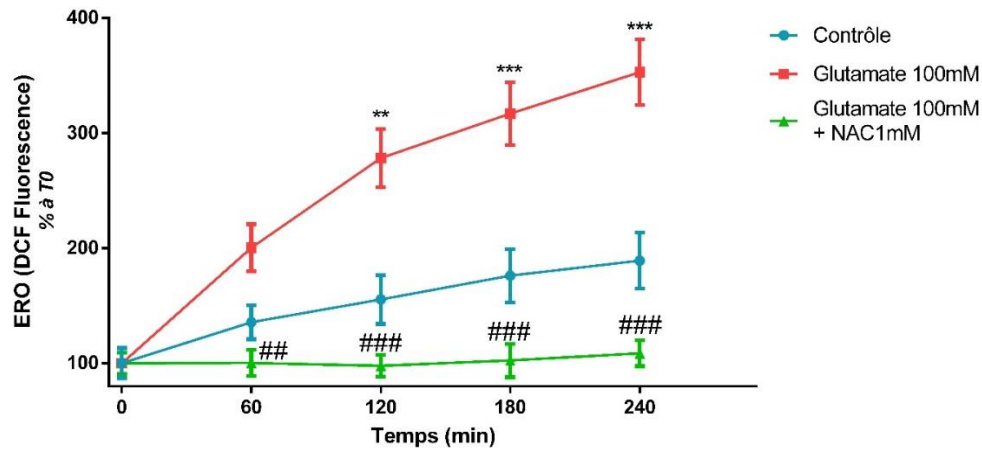


Figure 57 : Effet de la NAC sur la production d'ERO induite par le glutamate dans les cellules bEnd.3. Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (n=5). Les valeurs sont fixées à 100% pour les valeurs respectives à T0. ANOVA 2 facteurs à mesures répétées + test de Dunett, ** P < 0,01, *** P < 0,001 versus contrôle et ## P < 0,01, ### P < 0,001 versus glutamate.

2.2.1.2) Induction de la production d'ERO par le glutamate à 24h

Après 24h de traitement, le glutamate induit une augmentation significative de 30% de la production d'ERO (P < 0,05 ; Figure 58). L'addition de NAC prévient cette production d'ERO induite par le glutamate (P < 0,001 ; Figure 58).

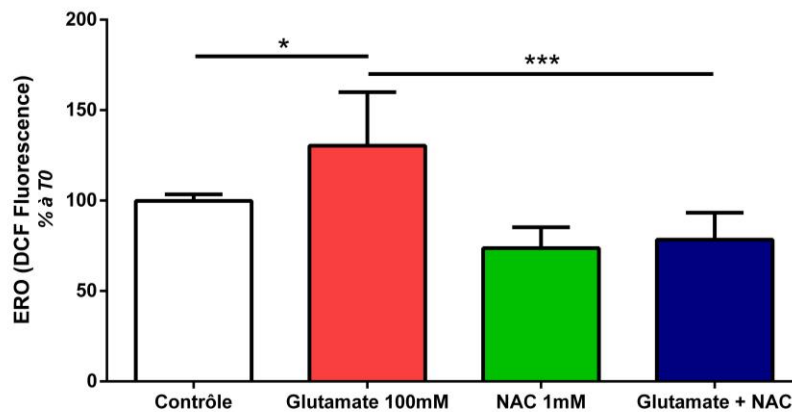


Figure 58 : Effet du glutamate et de la NAC sur la production des ERO par les cellules bEnd.3 à 24h. Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (n=5). Les valeurs sont fixées à 100% par rapports aux contrôles. ANOVA et t-test t avec correction de Bonferroni, * P < 0,05 et *** P < 0,001.

Afin de compléter cette mise au point, des études de toxicité ont été conduites.

2.2.1.3) Evaluation de la toxicité induite par le glutamate.

L'effet du glutamate (100mM) sur la mortalité (évaluée par coloration au bleu trypan) et l'activité métabolique (évaluée par le test au MTT) des cellules bEnd.3 a été examiné à 4h et 24h (Matériel et méthodes 2.2.1 et 2.2.2).

2.2.1.3.1) Protocole

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 50 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées par du milieu DMEM (cellules contrôles) ou du glutamate à 100mM pendant 4h et 24h.

2.2.1.3.2) Résultats

La mortalité des cellules contrôles est de $2,3 \pm 0,3\%$ à 4h et de $3,3 \pm 0,4\%$ à 24 h (Figure 59 A et C); le glutamate augmente significativement cette mortalité aux deux temps ($8,3 \pm 1,4\%$ à 4h ; $P < 0,001$) et $14,3 \pm 1,7\%$ à 24h ($P < 0,001$).

Le glutamate à 100mM induit une diminution significative de l'activité métabolique de 17% après 4h de traitement ($P < 0,01$; Figure 59.B) et de 50% après 24h de traitement ($P < 0,001$; Figure 59.D).

4 Heures

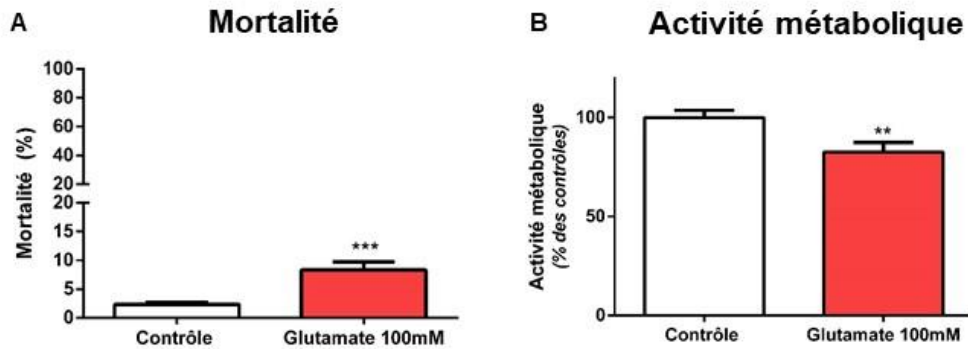


Figure 59 : Toxicité du glutamate après 4h (A, B) et 24h de traitement (C, D).

Effet du glutamate sur la mortalité cellulaire (A, C) et sur l'activité métabolique (B, D). Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (n=13-15). Test t de Student, ** P < 0,01, *** P < 0,001 versus « contrôle ».

2.2.1.4) Discussion

Le stress oxydant a été induit dans nos études par le glutamate car celui-ci est à l'origine du phénomène d'excitotoxicité qui participe à la production d'ERO lors d'une ischémie cérébrale (Choi and Rothman, 1990; Moriyoshi et al., 1991; Mosbacher et al., 1994; Pizzi et al., 1993). De plus, différentes études ont démontré l'expression des récepteurs glutamatergiques de type NMDA sur les cellules non neuronales (Hogan-Cann and Anderson, 2016; Macrez et al., 2016; Neuhaus et al., 2011) qui plus est sur les cellules endothéliales cérébrales (Krizbai et al., 1998; Sharp et al., 2003) et notamment sur les cellules bEnd.3 (Betzen et al., 2009; Kamat et al., 2015). Deux études avant la nôtre avaient également décrit une augmentation de la production d'ERO induite par le glutamate sur ces cellules bEnd.3 (Betzen et al., 2009; Scott et al., 2007). Dans ces deux études, l'implication des récepteurs NMDA était clairement démontrée et celle des récepteurs AMPA/ Kainate et métabotropiques écartée. Cependant, dans un modèle de stress oxydant induit par l'homocystéine,

les récepteurs glutamatergiques métabotropiques mGluR5 sont responsables de l'augmentation de la production d'ERO par les cellules bEnd.3. (Mayo et al., 2012).

Dans nos conditions, une surproduction d'ERO par le glutamate n'est observée que pour la concentration la plus élevée de 100mM. Cette concentration apparaît importante comparée à la littérature. Sur les mêmes cellules, une augmentation de la production d'ERO a en effet été observée dès 2,5mM de glutamate (Betzen et al., 2009). D'autres études sur des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales ont démontré une induction du stress oxydant à des concentrations de 0,1 à 2mM de glutamate avec la sonde DH123 (Parfenova et al., 2006); les faibles concentrations nécessaires dans ce cas pourraient s'expliquer par l'utilisation d'une culture primaire, plus sensible que les lignées cellulaires.

Concernant la mortalité cellulaire, celle des cellules contrôles reste inférieure à 10% même après 24h; cette mortalité, inhérente aux conditions de culture (inhibition de contact, détachement des cellules, consommation des nutriments), demeure limitée en raison de l'utilisation d'une lignée cellulaire immortalisée. Le glutamate augmente certes significativement la mortalité cellulaire, mais celle-ci reste néanmoins en dessous des 15% même après 24h de traitement. Outre la coloration par le bleu de trypan, nous avons aussi utilisé le dosage de la lactate déshydrogénase pour évaluer la mortalité de nos cellules; cette technique a confirmé nos résultats: le glutamate dans ce test a entraîné une mortalité de $7,7 \pm 0,9\%$ après 4h de traitement et de $14,3 \pm 1,7\%$ après 24h de traitement.

Concernant l'activité métabolique, le glutamate à 100mM l'a réduite de 17% après 4h de traitement et de 50% après 24h. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Scott et coll. (2007) qui ont montré une réduction de 50% de l'activité métabolique des cellules bEnd.3 après 24h de traitement par le glutamate à 30mM, la concentration de 100mM entraînant dans leur étude une réduction drastique de plus de 90% (Scott et al., 2007).

Au vu de ces résultats, la concentration de glutamate de 100mM a été sélectionnée car elle entraîne une forte production d'ERO associée à une mortalité limitée. Les traitements ne seront pas appliqués plus de 24h, en raison de la présence d'une souffrance cellulaire non négligeable mise en évidence par le test du MTT. Les paramètres du stress oxydant définis, nous avons pu l'utiliser pour étudier l'effet des NPC.

2.2.2.2) Effet des NPC sur le stress oxydant induit par le glutamate

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des NPC, les concentrations d'ERO ont été mesurées dans un premier temps grâce à la sonde H₂DCF –DA (Matériel et méthodes 2.3.1.1). D'autres marqueurs ont ensuite été mesurés pour évaluer l'effet antioxydant des NPC tels que leur impact sur la consommation en antioxydants endogènes et les lésions cellulaires.

2.2.2.2.1) Protocole

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 50 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées par le glutamate à 100mM pendant 4h ou 24h, seul, ou en association avec la NAC ou les NPC. La sonde H₂DCF-DA est ajoutée à une concentration de 20µM finale dans chaque puits. La production d'ERO est fixée à 100% chez les cellules contrôles.

2.2.2.2.2) Résultats

Le glutamate induit une augmentation significative de la production d'ERO de 29% à 40% selon les expériences après 4h de traitement ($P < 0,001$) et de 37% à 67% ($P < 0,001$) après 24h de traitement (Figure 60 et 61). La NAC réduit significativement cette production d'ERO induite par le glutamate de 59% à 68% après 4h de traitement ($P < 0,001$) et de 63% à 69 % après 24h de traitement ($P < 0,001$; Figure 60 et 61).

Après 4h de traitement, toutes les NPC induisent une réduction significative de la production d'ERO induite par le glutamate excepté les NPC ICONS 73 à la plus faible dose et les NPC ICONS nues à 1000µg/mL (Figure 60 A-D ; Tableau XIX).

4 Heures

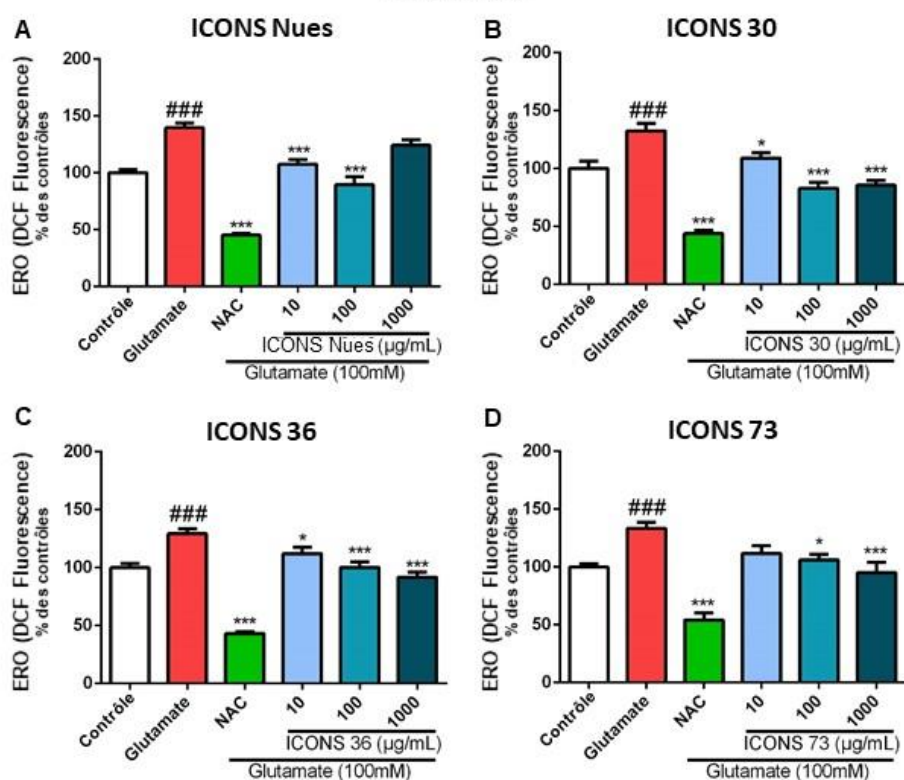


Figure 60 : Effet des différentes NPC sur la production des ERO induite par le glutamate (100mM) après 4h de traitement. La NAC, antioxydant de référence, a été administrée à la concentration de 1 mM. Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (n=8-16). ANOVA + test de Dunett, ### P < 0,001 versus « contrôle » et * P < 0,05, *** P < 0,001 versus « glutamate ».

Tableau XIX : Effet des différentes NPC sur la production des ERO induite par le glutamate (100mM) après 4h de traitement. Les résultats sont exprimés en % de diminution par rapport au glutamate. P < 0,05 ; P < 0,01 et P < 0,001 versus glutamate 100mM.

| Concentration | ICONS nues | ICONS 30 | ICONS 36 | ICONS 73 |
|---------------|------------|----------|----------|----------|
| 10 µg/mL | - 23% | - 18% | - 13% | - 16% |
| 100 µg/mL | - 36% | - 37% | - 23% | - 21% |
| 1 000µg/mL | - 11% | - 35% | - 29% | - 29% |

A 24 heures, les NPC nues ne présentent aucun effet antioxydant (Figure 61 E), les NPC ICONS 30 induisent un effet antioxydant uniquement à 100µg/mL avec une diminution de $26 \pm 3\%$ (P < 0,05 ; Figure 61 F), les NPC ICONS 36 à 100 et 1000µg/mL avec une diminution respective de $18 \pm 2\%$ et 17

± 2% (P < 0,01 ; Figure 61 G) et les NPC ICONS 73 à 1000µg/mL avec une diminution de 31 ± 3% (P < 0,001 ; Figure 61 H et Tableau XX).

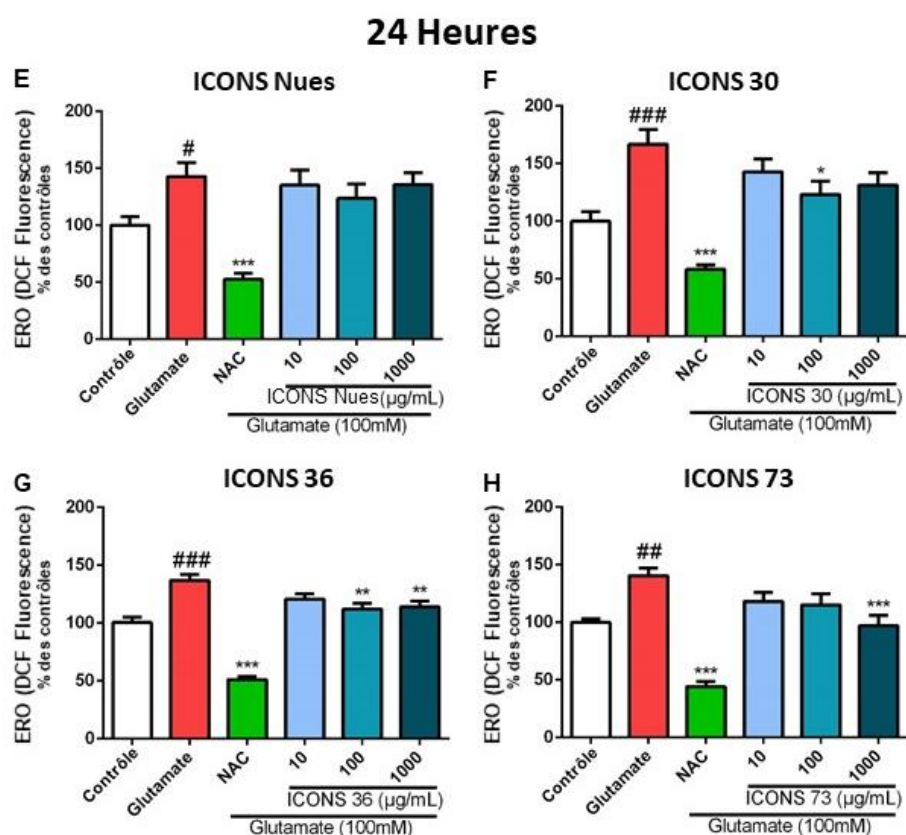


Figure 61 : Effet des différentes NPC sur la production des ERO induite par le glutamate (100mM) après 24h de traitements. La NAC, antioxydant de référence, a été administrée à la concentration de 1 mM. Les données sont exprimées en moyenne ± ESM (n=6-16). ANOVA + test de Dunnett, # P < 0,05, ## P < 0,01, ### P < 0,001 versus « contrôle » et * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 versus « glutamate ».

Tableau XX : Effet des différentes NPC sur la production des ERO induite par le glutamate (100mM) après 24h de traitement. Les résultats sont exprimés en % de diminution par rapport au glutamate. P < 0,05 ; P < 0,01 et P < 0,001 versus glutamate 100mM.

| | ICONS nues | ICONS 30 | ICONS 36 | ICONS 73 |
|------------|------------|----------|----------|----------|
| 10 µg/mL | - 5% | - 14% | - 12% | - 16% |
| 100 µg/mL | - 13% | - 26% | - 18% | - 18% |
| 1 000µg/mL | - 5% | - 21% | - 17% | - 31% |

2.2.2.2.3) Discussion

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que les NPC sont capables de limiter l'augmentation de la production d'ERO induite par le glutamate ; cet effet antioxydant semble plus important après 4h de traitement qu'après 24h.

Après 4h de traitement, les NPC ICONS nues, 30, 36 et 73 induisent un retour de la production d'ERO au niveau des contrôles à 100µg/mL. Cet effet est équivalent ou plus important à 1000µg/mL pour toutes les NPC sauf pour les ICONS nues. L'effet antioxydant plus limité des NPC nues à 1000 µg/mL comparé à 100µg/mL peut s'expliquer par la toxicité induite par les NPC nues ou par un biais dans la mesure du signal. En effet, les NPC nues s'agrègent à pH physiologique, rendant la solution opaque ce qui interagit avec la détection de fluorescence.

Après 24h de traitement l'effet antioxydant des NPC est moins marqué. L'effet antioxydant des NPC ICONS 30 est significatif uniquement à 100µg/mL, cependant l'augmentation induite par le glutamate était étonnamment supérieure (> 60%) comparé aux autres NPC (\approx 40%). L'effet antioxydant semble plus limité pour les NPC ICONS 73 ; cependant, à 100µg/mL, le pourcentage de diminution des ERO est identique à celui des NPC ICONS 36 et l'absence de significativité n'est donc due qu'à la variabilité plus importante dans l'expérience avec les NPC ICONS 73. De plus, la plus forte capacité antioxydante est mesurée avec les NPC ICONS 73 à 1000µg/mL.

L'article intitulé « Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells » s'est intéressé à l'utilisation de l'H₂DCF-DA comme méthode quantitative de mesure du stress oxydant sur les cellules traitées par des nanoparticules, en prenant notamment en compte les possibles interactions, interférences ou toxicités (Aranda et al., 2013). Bien que les NPC n'aient pas directement été testées dans cette étude, et malgré un effet de « quenching » des nanoparticules sur l'H₂DCF-DA, les conclusions de cette analyse sont que ce dosage est fiable pour la mesure quantitative du stress oxydant en présence de NP.

De nombreuses études ont mis en évidence un effet antioxydant des NPC avec la sonde H₂DCF-DA et ce sur différents types cellulaires et suite à diverses stimulations qui sont résumés dans le tableau XXI.

Tableau XXI : Effet des NPC sur la production d'ERO mesurée par la sonde H₂DCF-DA sur différents types cellulaires.

| Modèles | Stimulation de la production d'ERO | Taille NPC | [NPC] et temps | Effet sur les ERO | Références |
|-----------------------------------|---|------------|--------------------------------------|---|-----------------------|
| Cellules PC-12 (Phéochromocytome) | Glucose (25mg/mL) | 5-19nm | 100mM – 72h (17,2mg/mL)* | ↑ 60% ↓ 20% par NPC | Ghaznavi et al., 2015 |
| Cellules endovasculaires | H ₂ O ₂ 1mM 30 minutes | 20nm | 20 à 40µg/mL 24h | ↑ facteur 2 ↓ 50% par NPC | Chen et al., 2013 |
| Neurones primaires | H ₂ O ₂ 50µM 2h | 7-10nm | 25nM – 24h (4,3ng/mL)* | ↑ facteur 3 ↓ 50% par NPC | Arya et al., 2014 |
| Cellules HEK 293 | TBHP 0,5mM | 15nm | 5 à 10µg/mL 24h | ↑ 140% ↓ 30% par NPC | Qiu et al., 2015 |
| Macrophage | LPS 1µg/mL et IFN 100U/mL | 10nm | 10µM – 24h (1,7 µg/mL) * | ↑ facteur 2 ↓ 50% par NPC | Hirst et al., 2009 |
| Macrophage | Glutamate 5mM | 12nm | 200µg/mL 10, 30, 60min et 8h | ↑ facteur 3 ↓ facteur 3 par NPC | Schubert et al., 2006 |
| Progéniteurs cardiaques | H ₂ O ₂ 50µg/mL | 5-8nm | 10, 25 et 50µg/mL 1, 3 et 7 jours | ↑ facteur 6 ↓ par NPC : 30% (24h, 50µg/mL), 50% (3 jours, 25 et 50µg/mL) 70% (7 jours, 10 à 50µg/mL) | Pagliari et al., 2012 |
| Tranche d'hippocampe | Hypoxie – Hypoglycémie 30 min | 10 nm | 1 µg/mL | ↓ 30% par NPC | Estevez et al., 2011 |
| Modère murin | MOG | 3nm | 30mg/kg | ↓ 30% par NPC | Heckman |

| | | | | | |
|-------------|---------------------|------|--------|------------------------------------|-----------------------------|
| d'EAE | | | | | et al., 2013 |
| Rat Wistar | Plomb 25mg/kg | - | 1g/kg | ↑ facteur 2 ↓ facteur 2 par NPC | Hosseini et al., 2015 |
| Rat Sprague | Hypoxie hypobarique | 40nm | 5µg/kg | ↑ facteur 3 ↓ 50% par NPC | Arya et al., 2016 |

* Concentrations massiques non fournies et calculées à partir de la concentration molaire. **Abbreviations** : **EAE** : Encéphalomyélite, **MOG** : Toxine de Mycobacter Tuberculosis Pertussis, **TBH** : Hydroperoxyde de tert-butyle.

Le tableau XXI souligne la capacité de la sonde H₂DCF-DA à quantifier un stress oxydant par augmentation de la production d'ERO, induit par des stimuli très divers et sur différents types cellulaires. L'augmentation de la production de radicaux libres varie de 50% à 600% (facteur 6) en fonction des stimuli et du type de cellules. Les NPC sont principalement utilisées de 1 à 200µg/mL et induisent une diminution de la production d'ERO de 30 à 50%, ce qui concorde avec nos résultats (seule une étude a démontré une diminution de 300% de la production d'ERO par les NPC à 200µg/mL). Une étude a utilisé une très faible concentration de NPC (4,3ng/mL) et a mis en évidence une diminution de 50% de la production d'ERO induite par le glutamate. La faible concentration utilisée peut s'expliquer par leur modèle de culture cellulaire de neurones primaires, nettement plus sensibles que les lignées immortalisées. Enfin, une étude a utilisé une concentration de NPC très importante (17,2mg/mL) et n'a mesuré qu'une diminution de 20% de la production d'ERO, qui pourrait être due à la durée du traitement (72h).

De plus, plusieurs études ont utilisé l'H₂DCF-DA afin de quantifier la production d'ERO *in vivo* après traitement par des NPC (Tableau XXI). La sonde a été incubée sur des coupes de cervelet ou d'hippocampe (Estevez et al., 2011; Heckman et al., 2013) ou dans des homogénats d'hippocampe (Arya et al., 2016; Hosseini et al., 2015).

Bien que l'H₂DCF-DA soit la technique la plus utilisée pour montrer l'effet antioxydant des NPC, d'autres techniques ont également été utilisées telles que la Dihydrorhodamine 6G (Kilpatrick et al., 2013; Lee et al., 2013b), le kit OxiSelect™ (Selvaraj et al., 2015), le cristal violet (Shcherbakov et al., 2015), ou le réactif CellROX. De plus, d'autres techniques ont été utilisées afin de détecter l'anion superoxyde cellulaire dont l'hydroéthidine (Het; Liu et al., 2017), le dihydroéthidium (Hall et al., 2012), un kit de luminescence (Kit Diogenes; Hirst et al., 2009). Enfin, une étude a comparé

différentes sondes qui mesurent la production d'ERO et a démontré que l'H₂DCF-DA était supérieur à l'HFLUOR (dihydrofluorescein), à la dihydrorhodamine et aux 5 et 6DH-DA (5[and 6]-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein ; Hempel et al., 1999).

Cependant, la sonde **H₂DCF-DA** ne permet d'avoir accès qu'à la production globale des ERO par la cellule ; afin de préciser les effets antioxydants de nos NPC, nous avons recherché si elles pouvaient agir sur la production mitochondriale d'ERO et plus particulièrement celle d'anions superoxyde.

2.2.2.3) Effet du glutamate et des NPC sur la production mitochondriale d'anions superoxyde

2.2.2.3.1) Protocole

La production mitochondriale d'anions superoxyde a été détectée grâce au réactif MitoSOX™ Red (Matériel et méthodes 2.3.1.2).

Les cellules bEnd.3 ont été ensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 200 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivés pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 4h par le DMEM (cellules contrôles), le glutamate (100mM), l'H₂O₂ (2mM ; produit oxydant de référence) et les NPC nues, ICONS, 30, 36 et 73 à 100µg/ml. Après les traitements, les cellules ont été lavées, puis décollées par la trypsine. La trypsine est inactivée par ajout de milieu DMEM, puis les cellules sont transférées dans des tubes eppendorff et centrifugées à 100g pendant 5minutes à température ambiante. Le surnageant est retiré et la solution de MitoSOX™ Red est ajoutée dans chaque tube eppendorf et l'ensemble est incubé pendant 20 minutes. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives (ou marquées) et en intensité de fluorescence par cellule (Figure 62).

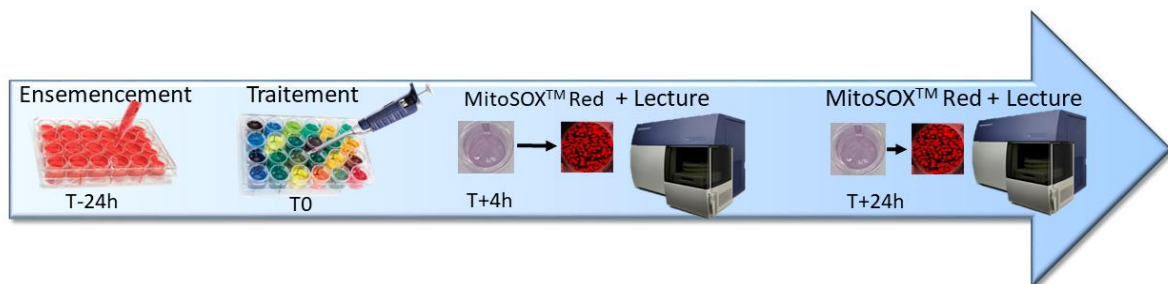


Figure 62 : Protocole de détection des anions superoxyde mitochondriaux par le MitoSOX™ Red.

2.2.2.3.2) Résultats

Dans un premier temps, la production mitochondriale d'anions superoxyde a été évaluée dans les cellules contrôles et après traitement de 4h par le glutamate à 100mM ou l'H₂O₂ à 2mM (Figure 63). Le pourcentage de cellules contrôles positives est de $1,1 \pm 0,1\%$; ce pourcentage n'est pas augmenté par le glutamate ($2,6 \pm 0,1\%$). En revanche, l'H₂O₂ augmente significativement le nombre de cellules positives : $15,3 \pm 3,7\%$ ($P < 0,01$).

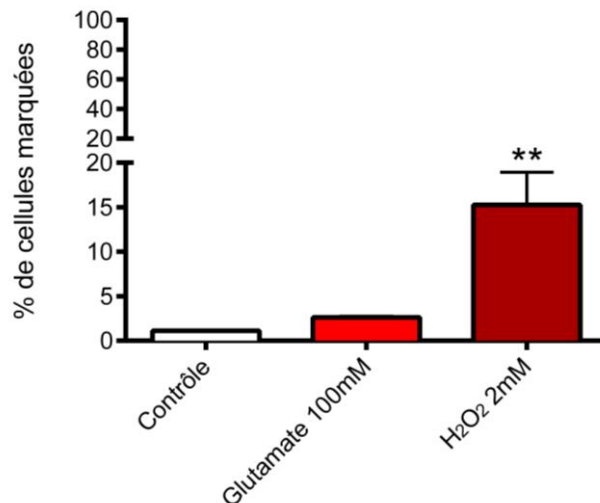


Figure 63 : Effet du glutamate (100mM) et de l'H₂O₂ (2mM) sur la production mitochondriale d'anions superoxyde après 4h de traitement. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules marquées. Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (n=3). ANOVA + test de Dunett ** $P < 0,01$ versus « contrôle ».

Au vu de ces résultats, le potentiel antioxydant des NPC sur la production mitochondriale d'anions superoxyde a été évalué en présence d'H₂O₂ à 2mM (Figure 64). Dans cette étude, le pourcentage de cellules contrôles marquées est de $2,3 \pm 0,4\%$ avec une intensité de fluorescence par cellule de 27 ± 1 UA. L'H₂O₂ multiplie par 16 le nombre de cellules marquées ($38,2 \pm 4,4\%$, $P < 0,001$) et par 4 l'intensité de fluorescence par cellule (112 ± 13 UA, $P < 0,001$).

Les NPC nues et les NPC ICONS 30 ne modifient pas significativement le taux de cellules marquées alors que les NPC ICONS 36 tendent à le diminuer ($25,3 \pm 4,3\%$; $P=0,0669$). Seules les NPC ICONS 73 induisent une diminution significative de 47% du taux cellules marquées ($22,0 \pm 2,8\%$; $P < 0,05$; Figure 64).

Concernant l'intensité de fluorescence par cellule, les ICONS nues n'induisent aucune modification (122 ± 13 UA). Toutes les NPC recouvertes induisent une diminution de l'intensité de fluorescence par cellule, celle-ci est non significative pour les NPC ICONS 30 (82 ± 15 UA), proche de la

significativité pour les NPC ICONS 36 (74 ± 13 UA, soit une réduction de 34% ; $P = 0,0848$) et significative pour les NPC ICONS 73 (67 ± 6 UA, soit une réduction de 40% ; $P < 0,05$; Figure 64).

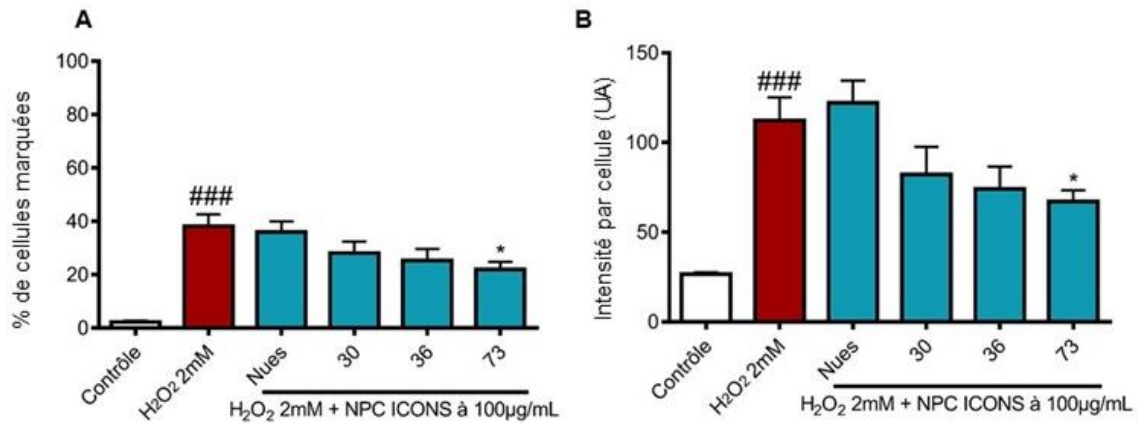


Figure 64 : Effet des NPC (100µg/mL) sur la production mitochondriale d'anions superoxyde induite par 4h de traitement par l'H₂O₂ (2mM). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules marquées (A) et en intensité de fluorescence par cellule en unité arbitraire (UA ; B). Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (n=8). ANOVA + test de Dunett ### $P < 0,001$ versus « contrôle » et * $P < 0,05$ versus « H₂O₂ 2mM ».

2.2.2.3.3) Discussion

Le glutamate n'a pas augmenté la production d'anion superoxyde au niveau de la mitochondrie dans nos conditions ; ceci suggère que l'augmentation des ERO totaux observée avec le glutamate et l'effet antioxydant des NPC sur cette production ne sont pas liés à un effet sur la mitochondrie. Ce résultat est assez étonnant et aurait pu être confirmé en réalisant de la microscopie à fluorescence. Un co-marquage de la mitochondrie par un anticorps (anti-HSP60 [Heat shock protein 60], anti-TUFM [Tu elongation factor] ou anti-CS [Citrate synthase]) et par la sonde MitoSoxRed aurait pu confirmer la spécificité du marquage. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la génération mitochondriale d'anion superoxyde (TEMPO, Mito-TEMPO) aurait pu permettre de vérifier que les ERO produits par le glutamate n'avaient pas pour origine la mitochondrie. Dans ce cas, il aurait été intéressant d'étudier la contribution de la NADPH-oxydase à la production d'ERO dans nos conditions.

Une étude sur des astrocytes avec le réactif MitoSoxRed a démontré une augmentation rapide et transitoire, de l'ordre de quelques minutes, de la production mitochondriale d'anions superoxyde après traitement par le glutamate (Azarias and Chatton, 2011; Azarias et al., 2011) ; ces données

pourraient suggérer que la durée de traitement de 4h est trop importante dans notre étude et qu'il aurait été intéressant de refaire l'étude à des temps précoces. Néanmoins, les NPC étant actives après 4h de traitement par le glutamate, nous n'avons pas réalisé cette étude.

Nous avons donc décidé d'étudier l'effet des NPC sur la production mitochondriale des anions superoxyde induite par l' H_2O_2 afin de mieux caractériser leurs capacités antioxydantes. Nos résultats montrent une augmentation de la production des ERO avec l' H_2O_2 dans les cellules bEnd.3 en accord avec d'autres études (Kamat et al., 2015).

Les NPC ont induit une diminution de 32 à 47% de la production mitochondriale d'anions superoxyde mais significative uniquement pour les NPC ICONS 73 en raison notamment d'une variabilité importante. A titre de comparaison, une autre étude a démontré une diminution significative de seulement 15% des taux de MitoSox Red après addition de NPC sur un modèle d'ischémie sur tranche d'hippocampe (Estevez et al., 2011).

Hormis l'anion superoxyde d'autres ERON peuvent être détectés spécifiquement dont l' H_2O_2 , le NO et l'ONOO- :

- L' H_2O_2 est principalement détecté par le kit « Amplex Red Hydrogen Peroxidase » (Heckert et al., 2008; Liu et al., 2017c; Pirmohamed et al., 2010) mais d'autres sondes ou kits existent tels que « Tremo Cellular Hydrogen Peroxide sensor (P36243, Thermofisher) ou « Intracellular Hydrogen Peroxide Assay Kit » (MAK164, Sigma).
- Le NO peut être mesuré par la sonde DAF-FM (Estevez et al., 2011) ou le réactif de Griess (Selvaraj et al., 2015) qui mesure ses dérivés nitrates et nitrites.
- L'anion ONOO- peut être détecté par spectroscopie UV – visible (Dowding et al., 2013).

En conclusion, ces études ont permis de montrer que certaines NPC (ICONS 73) peuvent agir au niveau mitochondrial pour réduire le stress oxydant.

2.2.2.4) Effet des NPC sur la consommation des antioxydants endogènes

Après avoir démontré la capacité des NPC à diminuer la production d'ERO *in vitro* en condition de stress oxydant, nous avons recherché si cet effet était associé à une diminution de la consommation des antioxydants endogènes. Pour cela, nous avons mesuré l'effet des NPC sur le glutathion et les thiols totaux.

2.2.2.4.1) Effet des NPC sur la consommation de glutathion au cours d'un stress oxydant

2.2.2.4.1.1) Protocole

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 200 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont été ensuite traitées par le DMEM (cellules contrôles), par le glutamate (100mM) et les NPC ICONS 30 et 36 à 10, 100 et 1000µg/mL, pendant 4h ou 24h (les NPC ICONS 73 n'avaient pas encore été synthétisées au moment de ce dosage). Les cellules ont été grattées en milieu acide entraînant une précipitation des protéines. Après centrifugation, le glutathion a été dosé dans le surnageant (Matériel et méthodes 2.3.2.2) et les protéines dans le culot. Les résultats sont exprimés en µmol de glutathion par mg de protéines.

2.2.2.4.1.2) Résultats

Le glutamate entraîne une réduction significative des concentrations de glutathion de 42 à 47% après 4h de traitement ($P < 0,001$; Figure 65. A et C). Les NPC ICONS 30, comme les NPC ICONS 36, n'ont aucun effet sur cette chute de glutathion induite par le glutamate.

Après 24h de traitement, la consommation de glutathion induite par le glutamate est de 81 à 89% ($P < 0,001$; Figure 65 B et D). Les NPC ICONS 30 et 36 n'ont aucun effet sur cette chute de glutathion induite par le glutamate.

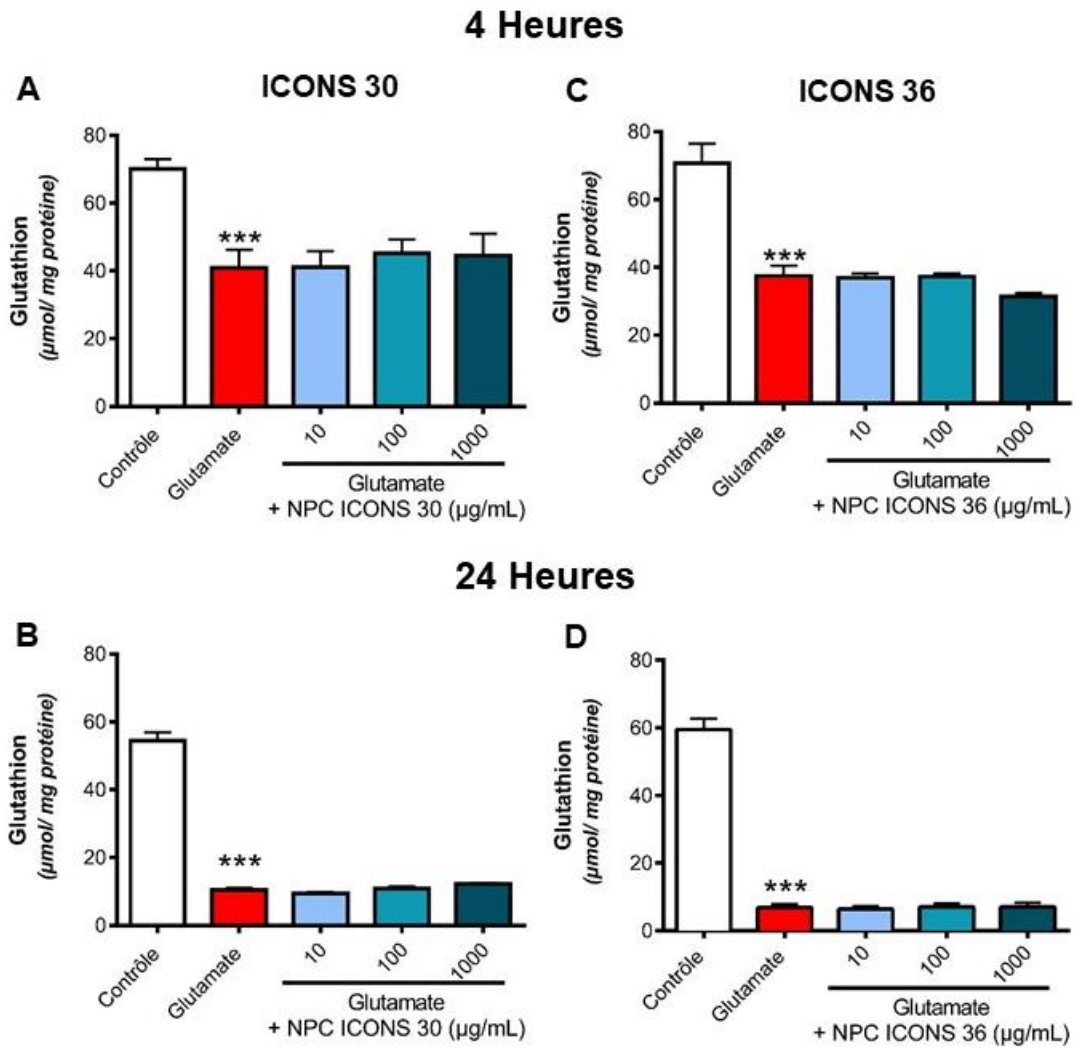


Figure 65 : Effet du glutamate (100mM) et des NPC ICONS 30 (A, B) et 36 (C, D) sur les concentrations de glutathion après 4h (A, C) et 24h (B, D) de traitement. Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (n=5). ANOVA + test de Dunett *** P < 0,001 versus « contrôle ».

2.2.2.4.2) Effet des NPC sur la consommation de thiols totaux au cours d'un stress oxydant

2.2.2.4.2.1) Protocole

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 50 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules sont ensuite traitées par le DMEM (cellules contrôles) ou par le glutamate (100mM) associé ou non aux NPC nues, ICONS 30, 36 ou 73 (100µg/mL). Les puits ont ensuite été vidés, les cellules lysées et le réactif Thiol Green Indicator ajouté dans chaque puits (Matériel et méthodes 2.3.2.1). La quantité de thiols ainsi déterminée est

normalisée par la concentration en protéines de l'échantillon. Les résultats sont exprimés en μmol de thiols totaux par g de protéines.

2.2.2.4.2.2) Résultats

La concentration de thiols totaux dans les cellules bEnd.3 contrôles est de $156 \pm 7 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines après 4h (Figure 66 A). Le glutamate entraîne une diminution significative de 31% de la concentration de thiols totaux ($P < 0,01$). L'addition des NPC nues, ICONS 30, 36 et 73 ne réduit pas la chute des concentrations de thiol totaux induite par le glutamate.

Après 24h, la concentration de thiols totaux des cellules contrôles est de $72 \pm 3 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines et elle est significativement réduite de 68 % par le glutamate ($23 \pm 3 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines, $P < 0,001$; Figure 66.B). Les NPC nues, ICONS 30 et 36 ne permettent pas de limiter la consommation en thiols induite par le glutamate. Pour les NPC ICONS 73, l'augmentation de 26% des concentrations de thiols n'est pas significative non plus ($P=0,28$).

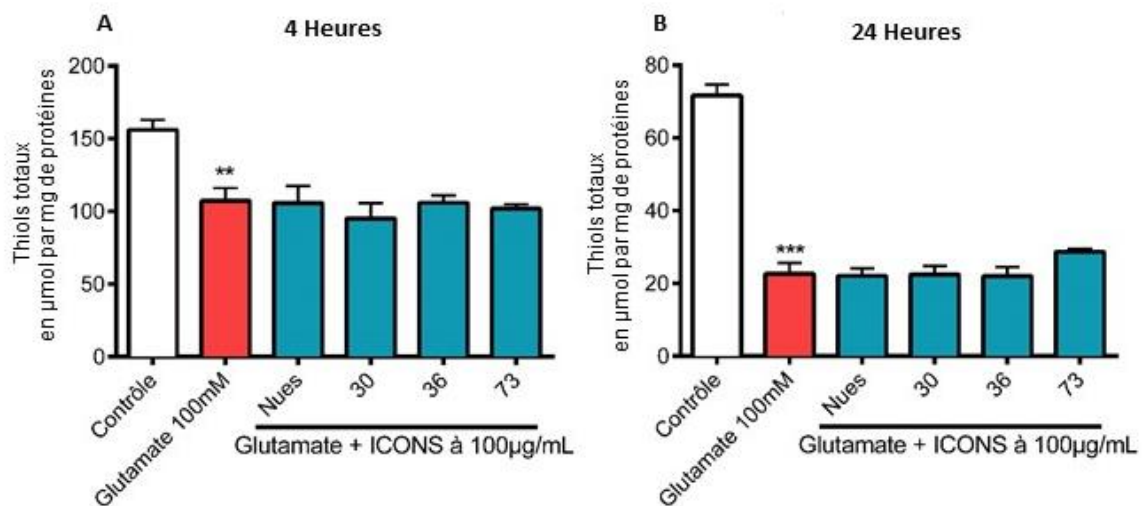


Figure 66 : Effet des NPC sur la consommation des thiols totaux induite par le glutamate après 4h (A) et 24h (B) de traitement. Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM ($n=8$). ANOVA + test de Dunett ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ versus « contrôle ».

2.2.2.4.3) Discussion

Le glutamate entraîne une consommation de glutathion, et plus généralement des thiols cellulaires dès 4h de traitement et de façon encore plus marquée à 24h. Ceci est en accord avec l'augmentation de la production d'ERO entraînée par le glutamate et valide à nouveau notre modèle de stress oxydant.

Il est à noter qu'une validation par la NAC n'est pas possible avec ce test car c'est un précurseur du glutathion. En effet, le glutathion est un tripeptide composé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Or, le co-traitement par le glutamate et la NAC apporte de l'acide glutamique et de la cystéine soit deux des trois acides aminés composant le glutathion. Au début de notre étude, la NAC a été utilisée comme antioxydant de référence lors du dosage du glutathion (données non présentées). Bien que la NAC seule n'ait pas augmenté significativement la quantité de glutathion le co-traitement glutamate et NAC augmentait significativement d'un facteur 2 environ le taux de glutathion comparé à la condition contrôle. Cependant, cela pouvait indiquer soit que la NAC piègeait bien les ERO produits par l'action du glutamate et préservait les stocks de glutathion, soit que l'apport des deux acides aminés permettaient d'augmenter la synthèse de glutathion.

Aucune des NPC n'a permis de limiter la consommation de glutathion et de thiols totaux induite par le glutamate. Deux hypothèses peuvent être évoquées : la meilleure affinité des ERON pour les cystéines contenues dans le glutathion et les thiols totaux. En effet, les ERON pourraient réagir rapidement avec les cystéines des systèmes antioxydants, consommer rapidement ces systèmes antioxydants et ce avant même que les NPC soient internalisées. Une fois le glutathion et les thiols totaux consommés, les ERON pourraient être captés par les NPC, qui deviennent plus disponibles que les systèmes antioxydants, étant majoritairement oxydés. La deuxième hypothèse concerne la durée de traitement : en effet, le temps que les systèmes antioxydants réduisent le glutathion et les thiols totaux oxydés pourraient être plus long que nos temps de traitements de 4h et 24h. Ainsi, il aurait été intéressant de mesurer les taux de glutathion et de thiols totaux à des temps plus tardifs (48h ou 72h par exemple).

La consommation de glutathion et de thiols totaux est très importante après 4h et 24h de traitement par le glutamate à 100mM. Le modèle de stress oxydant et la concentration optimale en glutamate ont été optimisés sur la production d'ERON totaux (par la sonde H₂-DCF-DA). Il aurait également été intéressant de tester différentes concentrations de glutamate (2,5mM à 100mM) sur la consommation du glutathion et de thiols totaux afin de sélectionner une concentration de glutamate moins importante. En effet, la concentration en glutamate de 100mM pourrait induire une

consommation trop importante et quasiment irréversible des quantités de thiols totaux et glutathion.

Les techniques de détection utilisées dans notre étude ne semblent pas être mises en cause. En effet, une réduction de la consommation **de thiols totaux** par les NPC a déjà été observée avec cette technique dans des modèles de stress oxydant, que ce soit *in vitro* sur des cellules PC12 traitées par de fortes concentrations de glucose (Ghaznavi et al., 2015), ou *in vivo* dans le cerveau de rats traités par le plomb (Hosseini et al., 2015) ou le paraquat (Ranjbar et al., 2018). Cependant la concentration de NPC pour l'étude *in vitro* (17,2mg/mL) est 172 fois plus importante que la dose de 100µg/mL utilisée dans notre étude (Ghaznavi et al., 2015). Les doses de NPC utilisées dans les modèles *in vivo* sont de 1 000mg/kg (Hosseini et al., 2015) et 60mg/kg (Ranjbar et al., 2018) mais sont difficilement comparables aux études *in vitro* (respectivement 17 et 1mg/mL en concentration plasmatique).

Cependant, hormis les doses conséquentes utilisées dans ces études, elles ont toutes utilisées des prétraitements ou des durées de traitement plus longues. Ainsi, dans la première étude réalisée *in vitro*, les cellules ont été traitées par les NPC 72h avant l'induction du stress oxydant (Ghaznavi et al., 2015). De plus, dans la seconde étude, les animaux ont également été prétraités 2 jours avant l'induction du stress oxydant (Hosseini et al., 2015). Ainsi ces informations peuvent conforter notre première hypothèse concernant les délais d'action des NPC. De fait, le prétraitement des cellules ou des animaux par les NPC permet d'augmenter progressivement la quantité intracellulaire de NPC, ainsi, lors de l'induction du stress oxydant, les ERON peuvent réagir avec les systèmes antioxydants mais également avec les NPC présentes dans la cellule. Enfin, une étude a réalisé des traitements par leur inducteur de stress oxydant en présence des NPC pendant 2 semaines (Ranjbar et al., 2018). Cela conforte principalement notre deuxième hypothèse : le temps de régénération du glutathion et des thiols totaux pourrait être supérieur à 24h.

Concernant le **glutathion**, une étude a mis en évidence le rétablissement de ses taux par des NPC suite à une exposition à un extrait de cigarette sur des cellules H9c2 (diminution d'environ 30%, $P < 0,05$; Niu et al., 2011). Une autre étude a montré que le cérium rétablissait les taux hépatiques de GSH effondrés par l'injection de monocrotaline (Amin et al., 2011). Nos résultats semblent donc en désaccord avec les données de la littérature (Amin et al., 2011; Niu et al., 2011). Les mêmes hypothèses proposées pour les thiols totaux peuvent cependant être émises concernant la mesure du glutathion. En effet, ces deux études ont également administré les NPC en prétraitement, dans la première étude 24h avant l'induction du stress oxydant (Niu et al., 2011), dans la seconde étude, une injection de NPC a été réalisée avant et après l'induction du stress oxydant (Amin et al., 2011).

Au vu de ces données, nous aurions également pu réitérer nos expériences en prétraitant les cellules bEnd.3 avec nos NPC, cependant, la perspective de l'utilisation de nos NPC pour le traitement de l'AVC, n'est pas réellement compatible avec un prétraitement.

Afin d'examiner malgré tout le bénéfice de l'effet des NPC sur la production d'ERO, nous avons évalué leurs capacités à diminuer les attaques cellulaires de ceux-ci.

2.2.2.5) Effet des NPC sur les dommages liés au stress oxydant

Les ERO peuvent s'attaquer aux protéines, aux lipides et à l'ADN. Nous nous sommes attachés plus spécifiquement aux lésions de l'ADN et nous avons recherché une oxydation de la guanine en 8-hydroxyguanine (ou 8-OHdG) dans notre modèle, ainsi que l'effet des NPC sur ce paramètre.

2.2.2.5.1) Protocole

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits contenant des lamelles en verre au fond des puits, à une densité de 200 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées par le DMEM (cellules contrôles), le glutamate (100mM) et les NPC nues, ICONS 30, 36 et 73 (100 µg/mL). Les cellules sont lavées, fixées et perméabilisées. La présence de 8-OHdG est détectée par immunofluorescence ; les images ont été analysées avec le logiciel Image J. L'intensité de fluorescence a été mesurée sur la cellule entière pour quantifier l'oxydation des ARN et de l'ADN, mais également sur le noyau seul permettant de quantifier l'oxydation de l'ADN uniquement (Matériel et méthodes 2.3.3).

2.2.2.5.2) Résultats

Après 4h de traitement, le glutamate induit une augmentation significative de 43% de l'oxydation des ADN et des ARN ($P < 0,001$, Figure 67.A). Les NPC ICONS 30 et 73 diminuent significativement cette oxydation de 22% ($P < 0,05$) et 29% ($P < 0,01$) respectivement. En revanche, les NPC nues et les NPC ICONS 36 n'induisent aucun effet (Figure 67 A).

Après 24h de traitement, le glutamate induit également une augmentation significative de 51% de l'oxydation des ADN et des ARN ($P < 0,01$; Figure 67 B). Les NPC ICONS 30 et 73 tendent à diminuer

cette oxydation de 25% ($P = 0,0524$) et 23% ($P = 0,0775$) respectivement. En revanche, les NPC nues et les NPC ICONS 36 n'induisent aucun effet (Figure 67 B).

Concernant l'**oxydation de l'ADN, après 4h de traitement**, le glutamate induit une augmentation significative de l'oxydation des ADN de 149% ($P < 0,001$, Figure 67 C). Les NPC ICONS nues, 30 et 73 induisent une diminution significative de l'oxydation de l'ADN induite par le glutamate, respectivement de 46% ($P < 0,001$), 26% ($P < 0,001$) et 23% ($P < 0,05$). En revanche, les NPC ICONS 36 ne présentent aucun effet sur l'oxydation de l'ADN (Figure 67 C).

Après 24h de traitement, le glutamate induit une augmentation de l'oxydation de l'ADN de 49% ($P < 0,01$, Figure 67.D). Seules les NPC ICONS 30 démontrent une diminution significative de 41% de l'oxydation de l'ADN induite par le glutamate après 24h de traitement ($P < 0,001$). Les NPC ICONS nues présentent une tendance à la diminution de l'oxydation de l'ADN de 24% ($P = 0,0780$). En revanche, aucun effet des NPC ICONS 36 et 73 n'a été démontré quant à leur capacité à réduire l'oxydation des ADN (Figure 67 D).

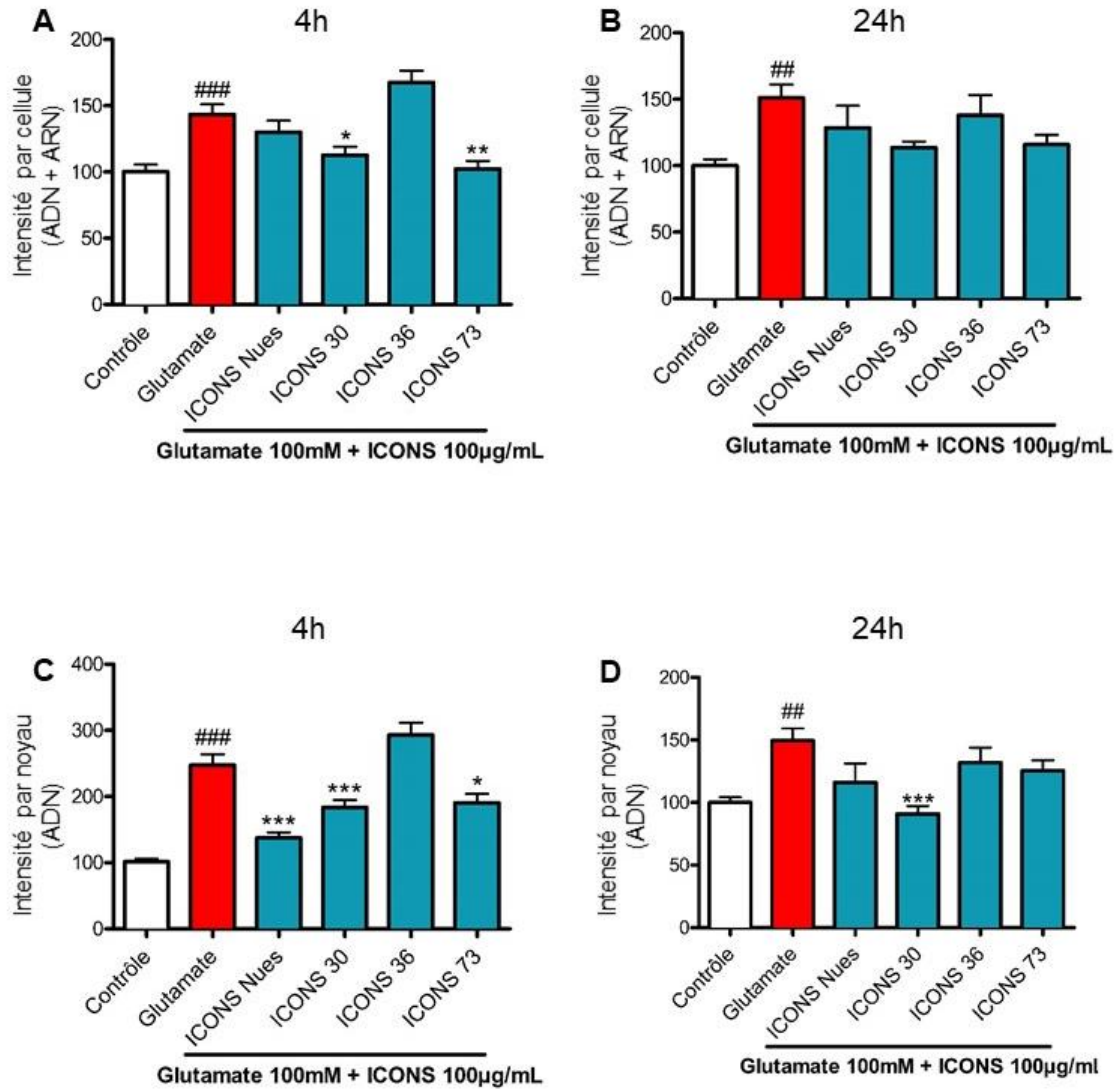


Figure 67 : Effet du glutamate (100mM) et des NPC (100µg/mL) sur l'oxydation des acides nucléiques. Mesure de la 8-OHdG quantifiée sur l'ADN et l'ARN (A, B) et l'ADN uniquement (C, D) après 4h (A, C) et 24h (B, D) de traitement. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence des contrôles. Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (n=7). ANOVA + test de Dunett, ## P < 0,01, ### P < 0,001 versus « contrôle » et * P < 0,05, ** P < 0,01 *** P < 0,001 versus « glutamate ».

2.2.2.5.3) Discussion

Dans l'ensemble, ces données démontrent que les NPC protègent de l'oxydation de l'ADN et de l'ARN notamment après 4h de traitement et pour les NPC ICONS nues, 30 et 73. A l'inverse, les ICONS 36 qui présentent pourtant un effet antioxydant important en captant les ERO (Figure 60 et 61) ne démontrent aucune diminution de l'oxydation des ADN et ARN.

Comme discuté précédemment dans les atteintes des systèmes antioxydants endogènes, les deux mêmes hypothèses peuvent être évoquées : 1) l'oxydation des ADN et ARN est un processus rapide qui survient avant l'internalisation des NPC, et 2) les temps auxquels sont réalisées les mesures sont peut-être trop précoces ou trop tardifs pour que les NPC préviennent l'oxydation des acides nucléiques.

D'autres études ont mesuré le 8-OHdG après traitement par des NPC (Arya et al., 2016; Hirst et al., 2013). La première étude a quantifié les taux de 8-OHdG dans les urines de souris après induction d'un stress oxydant par injection de tétrachlorure de carbone (CCl₄; Hirst et al., 2013). Cette étude n'a démontré aucune augmentation des taux de 8-OHdG induite par le CCl₄, ni diminution induite par la NAC ou les NPC (Hirst et al., 2013).

A l'inverse, une deuxième étude plus récente a mesuré les taux de 8-OHdG dans l'hippocampe après une hypoxie chez le rat (Arya et al., 2016). Cette étude a démontré une augmentation de 44% des taux de 8-OHdG suite à l'hypoxie ; cette augmentation est réduite de 23% par un prétraitement par les NPC.

L'effet des NPC aurait pu être mesuré sur de nombreux autres dommages liés au stress oxydant, notamment sur les autres constituants de la cellule : les protéines et les lipides. Nous avons réalisé des tests préliminaires pour mesurer la carbonylation des protéines et l'oxydation lipidique (données non présentées).

Les groupements carbonyles ont été dosés par une méthode chimique qui repose sur la formation d'hydrazones résultant d'une réaction de condensation mettant en jeu les groupements carbonyles et le groupement -NH₂ de la dinitrophénylhydrazine (DNPH). L'absorbance du DNPH est mesurée à une longueur d'onde de 370 nm ($\epsilon = 22000 \text{ mol.l}^{-1}\text{.cm}^{-1}$; Reznick et Packer, 1994). Bien que le dosage des protéines carbonylées soit largement utilisé dans la littérature pour la quantification du stress oxydant et en présence de NPC (Arya et al., 2016; Hardas et al., 2012; Niu et al., 2007; Tseng et al., 2012), nous n'avons pas réussi à démontrer une augmentation de la production de protéines carbonylées par le glutamate à 100mM ou par l'H₂O₂ à 2mM. La mise en évidence des atteintes des protéines pourrait être évaluée par la quantification de la 3-nitrotyrosine (3-NT) comme cela a déjà été réalisé et a permis de montrer l'effet protecteur des NPC (Dowding et al., 2013; Estevez et al., 2011; Hardas et al., 2012; Niu et al., 2007).

En ce qui concerne la lipoperoxydation, le protocole des TBARS (substances réagissant avec l'acide Thio barbiturique) a été utilisé. Les lipides polyinsaturés oxydés par les ERO sont dégradés en produit tel que le Malondialdéhyde (MDA). Le MDA est dosé avec de l'acide thiobarbiturique (TBA) pour

former un composé (MDA-TBA) qui peut être dosé par colorimétrie ($\lambda = 532\text{nm}$) ou fluorescence ($\lambda_{\text{Excitation}}$ et $\lambda_{\text{Emission}} = 532/553\text{nm}$). Malgré de nombreux essais et des gammes de MDA parfaitement détectables par le test, nous n'avons pas réussi à détecter de trace de MDA dans nos échantillons. Ce dosage est pourtant largement utilisé dans la littérature pour la quantification du stress oxydant, dont des études utilisant des NPC (Arya et al., 2016; Chen et al., 2013; Ghaznavi et al., 2015; Hirst et al., 2013; Hosseini et al., 2015; Yun et al., 2013).

2.2.2.6) Conclusion générale sur l'activité antioxydante des NPC

Dans un premier temps les activités SOD et CAT ont été mesurées en milieu acellulaire, ces activités semblent plus faibles pour toutes les NPC recouvertes notamment aux plus faibles concentrations, hormis les NPC ICONS 30 sur l'activité SOD.

La suite des études a été conduite sur une lignée de cellules endothéliales cérébrales (bEnd.3). Aucune des NPC n'a modifié la production d'ERO physiologique après 4h ou 24h de traitement quelle que soit la concentration (10, 100 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$).

Dans un premier temps, nous avons généré un modèle de stress oxydant par excitotoxicité pertinent dans le cadre de l'ischémie cérébrale. Ce modèle a pu être validé par la mise en évidence d'une augmentation de la production d'ERO, la consommation d'antioxydants endogènes tels que les thiols totaux dont le glutathion et l'augmentation de l'oxydation des acides nucléiques. Les NPC ont réduit l'augmentation de la production d'ERO induite par le glutamate à 100mM. De plus, l'effet est plus important pour les NPC recouvertes par rapport aux NPC nues. Dans l'ensemble, aucune NPC n'a permis de rétablir la consommation d'antioxydants endogènes, tels que les thiols totaux ou le glutathion, induite par le glutamate. Enfin, l'augmentation de l'oxydation de l'ARN et de l'ADN provoquée par le glutamate a été réduite par les NPC ICONS 30 et 73 après 4h de traitement, et l'oxydation de l'ADN seul a été réduite par les NPC nues et ICONS 30 et 73 après 4h de traitement.

Concernant la production d'anion superoxyde au niveau de la mitochondrie, les NPC ICONS 30 et 36 tendent à diminuer la production induite par l' H_2O_2 à 2mM mais seules les NPC ICONS 73 induisent une diminution significative.

3) Internalisation et localisation des NPC dans les cellules bEnd.3

L'internalisation des NPC dans les cellules endothéliales a été étudiée par différentes techniques. Tout d'abord, une approche quantitative a été réalisée par ICP-OES et cytométrie en flux. La localisation intracellulaire des NPC a ensuite été recherchée par microscopie à fluorescence et par microscopie électronique à transmission.

3.1) Quantification de l'internalisation des NPC dans les cellules bEnd.3

3.1.1) Analyse quantitative de l'internalisation des NPC par ICP-OES

Cette étude a été réalisée par nos partenaires de l'Unité MSC de l'Université Paris Diderot. Il s'agit d'une étude préliminaire permettant d'apprécier les interactions de toutes nos NPC avec les cellules bEnd.3 (contrairement à la cytométrie en flux qui ne permet de détecter que les NPC ICONS 36 et 73 couplées à la cyanine 5). Cette étude a été réalisée en absence ou en présence de glutamate, de manière à évaluer l'impact de ce traitement sur l'internalisation des NPC.

3.1.1.1) Protocole

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 1 000 000 de cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont été ensuite traitées par les NPC nues, ICONS 30, 36 et 73 à 1, 10, 100 et 1 000µg/mL avec ou sans glutamate (100mM) pendant 24h. Après différentes étapes de digestion (Matériel et méthodes 2.4.1.1), les échantillons ont été analysés par ICP-OES à l'Institut de Physique du Globe de Paris.

3.1.1.2) Résultats

En absence de glutamate, l'internalisation cellulaire des NPC est proportionnelle à leur concentration (Figure 68.A et B). Ainsi, pour les NPC nues, la quantité de cérium internalisée est de **0,30 ± 0,05** pg/cellules ; **3,10 ± 0,14** pg/cellules ; **22,14 ± 6,75** pg/cellules et **57,55 ± 15,55** pg/cellules aux concentrations respectives de 1, 10, 100 et 1000µg/mL (Figure 68.A). Cette quantité est plus faible

d'un facteur 100 environ, pour toutes les NPC recouvertes, quelle que soit la concentration. Aucune différence d'internalisation n'a été observée entre les différents recouvrements.

En présence de glutamate, l'internalisation cellulaire est toujours dépendante de la concentration en NPC (Figure 68.B). Pour les NPC nues, la quantité de cérium internalisée est de $0,16 \pm 0,057$ pg/cellules ; $0,58 \pm 0,01$ pg/ cellules ; $3,65 \pm 1,00$ pg/cellules et $73,43 \pm 4,32$ pg/ cellules aux concentrations respectives de 1, 10, 100 et 1000 μ g/mL (Figure 68.B). L'internalisation cellulaire des NPC diminue en présence de glutamate : respectivement de 46% à 1 μ g/mL ; 81% à 10 μ g/mL et 84% à 100 μ g/mL (Figure 68.A et B). Étonnamment la quantité de NPC internalisées à la concentration de 1000 μ g/mL est supérieure de 29% en présence de glutamate (Figure 68.A et B). De plus, l'internalisation cellulaire des NPC ICONS 30, 36 et 73 est plus faible que celle des NPC nues d'un facteur 100 également (Figure 68.B). Aucune différence entre les différents recouvrements n'a été observée sur l'internalisation cellulaire (Figure 68.B).

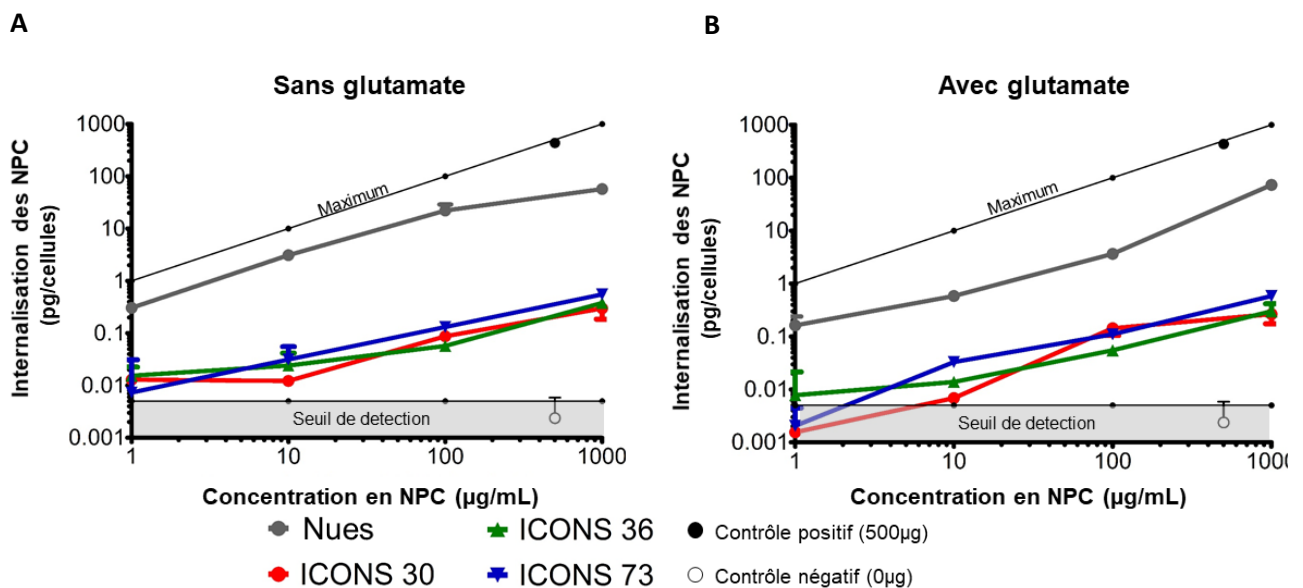


Figure 68 : Internalisation des NPC dans les cellules bEnd.3 par ICP-OES. Les NPC sont incubées seules (A) ou en présence de glutamate (B) pendant 24h. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type (n=3). Le « maximum » représente 100% d'internalisation.

3.1.1.3) Discussion

Les nanoparticules sont internalisées par 3 principaux mécanismes : la phagocytose, la diffusion et l'endocytose (He et al., 2010). Plusieurs paramètres des nanoparticules peuvent influencer leur internalisation dont leur taille (Danaei et al., 2018; He et al., 2010; Lu et al., 2009; Salatin et al.,

2015), leur fonctionnalisation et leur charge de surface (Asati et al., 2010; Harush-Frenkel et al., 2008; He et al., 2010; Murugan et al., 2015; Salatin et al., 2015).

Concernant la taille, plus les nanoparticules sont petites, plus elles sont internalisées (Donkor and Tang, 2014), ce qui peut également expliquer la plus importante internalisation des NPC nues par rapport aux NPC recouvertes. Pour la fonctionnalisation, dans la littérature, les recouvrements (dont les PEG) semblent augmenter l'internalisation cellulaire en réduisant l'agrégation des nanoparticules (Salatin et al., 2015; Vasir and Labhasetwar, 2008), ce qui est en désaccord avec nos résultats. Cependant, ces études ayant été menées dans un contexte *in vivo*, les nanoparticules agrégées sont rapidement phagocytées par les macrophages, diminuant ainsi leur temps de circulation et limitant leur internalisation cellulaire (Salatin et al., 2015; Storm et al., 1995). Concernant la charge de surface, les nanoparticules chargées positivement semblent présenter une meilleure internalisation *via* les interactions électrostatiques avec les membranes chargées négativement (He et al., 2010). Une étude a démontré que les nanoparticules chargées positivement sont 2,5 fois plus internalisées que les NP neutres et 25 fois plus que les NP chargées négativement (Karlsson et al., 1999). Ces données peuvent également expliquer la plus forte internalisation des NPC nues (chargées positivement) par rapport aux NPC recouvertes, globalement neutres. Cependant, d'autres études ont démontré une internalisation importante de NPC chargées négativement (Harush-Frenkel et al., 2008; Prijic et al., 2010).

Plusieurs études ont utilisé l'ICP afin de quantifier l'internalisation des NPC (Hardas et al., 2012; Qiu et al., 2015; Selvaraj et al., 2015) dont certaines sur des organes d'animaux ; elles seront détaillées par la suite (Heckman et al., 2013; Hirst et al., 2013; Kim et al., 2012).

Une étude n'a pas mis en évidence de différence d'internalisation entre les NPC nues et recouvertes à des temps précoces (après 1h d'incubation) ; en revanche, après 48h de traitement par les NPC, le taux de cérium dans les cellules était plus important pour les NPC nues comparé à celui des NPC recouvertes, ce qui semble corroborer avec nos résultats (Qiu et al., 2015). Cependant, cette étude a montré une diminution de l'internalisation d'un facteur 3 avec un recouvrement de PSPM (3-sulfopropylmethacrylate , chargé négativement) et de 20% avec un autre recouvrement PMETAC (2-(methacryloyloxy)ethyl-trimethylammoniumchloride), tandis que nos résultats rapportent un facteur 100 entre l'internalisation des NPC nues et celle des NPC recouvertes. Ces données soulignent l'importance du type de recouvrement dans les interactions avec les cellules.

Dans notre étude, les cellules ont été traitées par les NPC en absence ou en présence de glutamate. L'hypothèse étant qu'en présence de glutamate, et donc en condition de stress oxydant, les NPC seraient plus facile internalisées, expliquant ainsi les capacités antioxydantes des NPC en présence de

glutamate et non en condition physiologique. Cependant, nos résultats semblent démontrer l'inverse, excepté à la concentration de 1000µg/mL. En effet, de 1 à 100µg/mL une plus grande quantité de NPC recouvertes sont internalisées en absence de glutamate.

Une étude a démontré sur des macrophages que le LPS, facteur pro-inflammatoire à l'origine d'un stress oxydant, comme le glutamate, n'influçait pas l'internalisation cellulaire des NPC (Selvaraj et al., 2015).

Enfin, une étude a utilisé une autre technique de quantification, une méthode de spectrométrie UV-visible, afin de quantifier le taux de NPC dans des cellules épithéliales alvéolaires humaines (Mazzolini et al., 2016).

3.1.2) Analyse quantitative par cytométrie en flux

Cette technique permet de détecter les NPC ICONS 36-Cy5 et 73-Cy5 ; cependant, les cellules ont également été traitées par le DMEM et les NPC ICONS 30 afin de déterminer respectivement l'autofluorescence des cellules et celle des NPC.

3.1.2.1) Protocole

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 200 000 cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées par le DMEM (cellules contrôles) ou les NPC ICONS 30, 36-Cy5 ou 73-Cy5 à 100 µg/ml. Les échantillons sont passés dans le cytomètre (Matériel et méthodes 2.4.1.2). Les cellules viables sont sélectionnées grâce à leur taille et à leur granulosité, puis la fluorescence de chaque cellule est quantifiée. Les résultats sont exprimés en % de cellules fluorescentes et en intensité de fluorescence par cellule.

3.1.2.2) Résultats

Après 4h de traitement, $0,8 \pm 0,3\%$ des cellules traitées par les NPC ICONS 30 présentent une fluorescence (Figure 69.A) ; pour les cellules traitées par les NPC ICONS 36-Cy5 et les NPC ICONS 73-Cy5, respectivement **$96,2 \pm 1,4\%$** et **$99,8 \pm 0,1\%$** d'entre elles sont marquées par la cyanine-5 ($P < 0,001$ *versus* cellules contrôles et *versus* NPC ICONS 30).

Après 24h de traitement, $2,4 \pm 0,6\%$ des cellules traitées par les NPC ICONS 30 présentent une fluorescence ; ce pourcentage atteint **99,8 \pm 0,1%** pour les NPC ICONS 36-Cy5 et **99,9 \pm 0,0%** pour les NPC ICONS 73-Cy5 ($P < 0,001$ *versus* cellules contrôles et *versus* NPC ICONS 30 ; Figure 69.A).

L'intensité de fluorescence par cellule est de $11 \pm 0,3$ U.A après 4h de traitement et de $11 \pm 0,2$ U.A après 24h de traitement pour les cellules contrôles (Figure 69.B). Concernant les NPC ICONS 30, l'intensité de fluorescence par cellule est de $12 \pm 0,2$ U.A après 4h de traitement et $16 \pm 1,3$ U.A après 24h (Figure 69B). L'intensité de fluorescence par cellule après traitement par les NPC ICONS 36-Cy5 est supérieure à celle des cellules contrôles et des NPC ICONS 30 dès 4h (148 ± 20 U.A, $P < 0,001$ *versus* cellules contrôles et *versus* NPC ICONS 30) et augmente encore significativement après 24h de traitement (576 ± 90 U.A, $P < 0,001$ *versus* contrôle ; $P < 0,001$ *versus* NPC ICONS 30 ; et $P < 0,01$ *versus* NPC ICONS 36-Cy5 à 4h ; Figure 69 A et B). Il en est de même de l'intensité de fluorescence des cellules traitées par les NPC ICONS 73- Cy5 : 352 ± 28 U.A après 4h de traitement ($P < 0,001$ *versus* cellules contrôles *versus* NPC ICONS 30) et $2\,278 \pm 511$ U.A après 24h de traitement ($P < 0,001$ *versus* contrôle et *versus* ICONS 30 et $P < 0,05$ *versus* NPC ICONS 73- Cy5 4h ; Figure 69 A et B). De plus, l'intensité de fluorescence des cellules traitées par les NPC ICONS 73-Cy5 est plus importante que celle des cellules traitées par les NPC ICONS 36-Cy5 après 4h ($P < 0,001$) et 24h de traitement ($P < 0,05$; Figure 69 A et B).

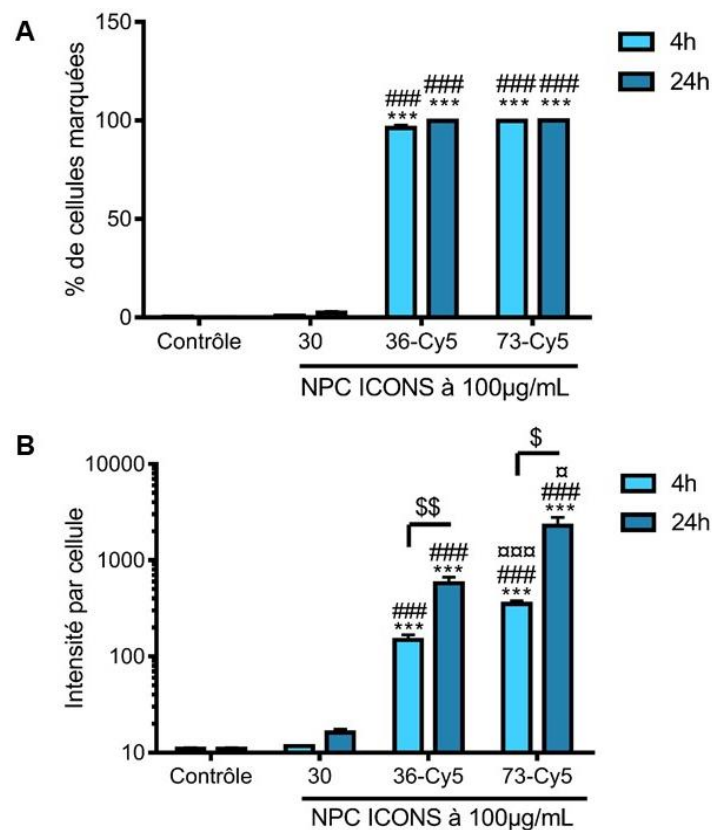


Figure 69 : Interaction des NPC avec les cellules bEnd.3 évaluée par cytométrie en flux après 4h et 24h de traitement. (A) Pourcentage de cellules marquées par la cyanine-5 et (B) Intensité de fluorescence par cellule. Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (n=5). ANOVA – 2 facteurs, et test de Dunett, *** P < 0,001 *versus* « contrôle » et ### P < 0,001 *versus* « NPC ICONS 30 » au même temps ; Test t de Student, \$ P < 0,05 et \$\$ P < 0,01 *versus* à 4 heures ; x P < 0,05 et xxx P < 0,001 *versus* « NPC ICONS 36-Cy5 ».

3.1.2.3) Discussion

Les traitements par les NPC ICONS 30 (dont le recouvrement ne comporte pas de fonction amine et qui ne fixent donc pas la cyanine-5) n'augmentent ni l'intensité de fluorescence par cellule, ni le pourcentage de cellules marquées par rapport aux cellules contrôles ; ceci montre que les NPC ne présentent pas d'autofluorescence. Plus de 95% des cellules traitées par les NPC ICONS 36-Cy5 ou 73-Cy5 sont fluorescentes dès 4h, suggérant une interaction rapide de ces NPC avec les cellules bEnd.3. Si le nombre de cellules marquées par la cyanine-5 n'augmente plus significativement entre 4 h et 24 h, en revanche, la quantité de fluorescence (et donc de NPC) par cellule, elle, augmente. L'intensité de fluorescence plus importante pour les cellules traitées par les NPC ICONS 73-Cy5 ne permet pas de conclure à une internalisation plus importante de ces dernières dans les cellules bEnd.3. En effet, le taux de cyanine-5 sur les NPC ICONS 73 est plus important que celui des NPC ICONS 36, ce qui explique l'intensité de fluorescence plus élevée pour les cellules traitées par les NPC ICONS 73.

Une étude a comparé les données de cytométrie en flux avec celles d'ICP et concluent qu'aucune différence n'est observée entre les données de cytométrie (NPC – Fluorophore) et d'ICP (NPC sans fluorophore), soulignant l'absence d'influence du fluorophore (Qiu et al., 2015). Cependant, ils mettent en évidence des différences plus importantes d'internalisation entre les NPC nues et les NPC recouvertes par ICP par rapport à la cytométrie: diminution de l'internalisation de 20% (PMETAC) et d'un facteur 3 (PSPM) par ICP *versus* une diminution de l'internalisation de 30% (PMETAC) et de 35% (PSPM) par cytométrie en flux (Qiu et al., 2015). Cela suggère une absence de linéarité entre la fluorescence et la quantité de NPC.

Les NPC conjuguées à un fluorophore ont été utilisées dans quelques études de la littérature afin d'étudier leur internalisation dans les cellules par cytométrie en flux (Bao et al., 2018; Gao et al., 2013; Qiu et al., 2015). Certaines de ces études ont rapporté des taux d'internalisation plus faibles que les nôtres (Bao et al., 2018; Qiu et al., 2015). L'étude de Qiu publiée en 2015 a comparé sur des cellules HEK293 l'internalisation de NPC nues (de 15nm) et recouvertes par du PSPM (3-sulfopropylmethacrylate, chargé négativement) ou par du PMETAC (2-(methacryloyloxy)ethyl-trimethylammoniumchloride, chargé positivement) sur une cinétique plus longue (jusqu'à 50

heures). Ces NPC fonctionnalisées par le FITC ont permis de démontrer une internalisation plus importante des NPC nues par rapport aux NPC recouvertes, ces taux restant cependant bien inférieurs aux nôtres, de l'ordre de 40% pour les NPC nues, 30% pour les NPC PSPM et 10% pour les NPC PMETAC après 4h de traitement (Qiu et al., 2015). Après 24h de traitement leurs taux d'internalisation étaient d'environ 95% pour les NPC nues, 65% pour les NPC PSPM et 30% pour les NPC PMETAC (Qiu et al., 2015). La charge du recouvrement pourrait modifier l'internalisation, cependant la littérature diverge sur ce sujet. Certaines études démontrent que les NPC avec un recouvrement chargé positivement sont mieux internalisées (Asati et al., 2010; Vincent et al., 2009), alors que d'autres montrent l'inverse avec une meilleure internalisation des NPC ayant un recouvrement chargé négativement (Patil et al., 2007; Qiu et al., 2015). De même, dans une étude plus récente utilisant des NPC pegylées (4,3nm nues et 20nm avec recouvrement) marquées par le RITC (Rhodamine isothiocyanate), des taux d'internalisation de 32% ont été retrouvés dans des cellules endothéliales cérébrales après 4h de traitement (Bao et al., 2018). Les auteurs de cette étude ont en outre observé une augmentation de l'internalisation qui passait à 74% (toujours à 4h), lorsque leurs NPC ciblaient le récepteur LRP (low density lipoprotein receptor related proteins) surexprimé dans les endothéliales cérébrales, après fonctionnalisation des NPC par l'angiopep-2. Une autre étude a montré l'intérêt d'un ciblage cellulaire en quantifiant l'internalisation dans des cellules U87 de gliome et des macrophages de NP recouvertes de MPEG-PCL (Methoxy poly(ethyleneglycol)-poly(ϵ -caprolactone), ciblant l'IL-13 et fonctionnalisées par le DiR (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide ; cyanine proche infrarouge ; Gao et al. 2013). Les auteurs ont mis en effet en évidence une internalisation significativement plus importante des NPC ciblantes comparée à celle des NP non ciblantes (Gao et al., 2013).

Notre étude de cytométrie en flux a permis de quantifier l'interaction des NPC avec les cellules bEnd.3, cependant, cette technique ne permet pas de déterminer si les NPC sont simplement fixées sur la membrane des cellules ou réellement internalisées, et dans ce dernier cas, quelle est leur localisation intracellulaire. D'autres techniques ont donc permis de préciser ces deux points.

3.2) Localisation intracellulaire des NPC

Des études de microscopie confocale et de microscopie électronique à transmission ont été mises en œuvre afin de déterminer la localisation intracellulaire des NPC.

3.2.1) Localisation intracellulaire des NPC par microscopie confocale

3.2.1.1) Protocole

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 200 000 cellules par puits sur des lamelles en verre dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées par le DMEM (cellules contrôles) ou les NPC ICONS 30, 36-Cy5 et 73-Cy5 à 100 µg/mL. Après traitement, les cellules ont été lavées, afin d'éliminer les NPC non liées aux cellules, puis fixées par du paraformaldéhyde à 4% pendant 10 minutes. Les filaments d'actine ont été marqués par la phalloïdine A488 au 1/50^{ème} pendant 15 minutes et les noyaux par le DAPI à 0,1µg/mL pendant 5 minutes. Les lames ont ensuite été observées au microscope confocal Leica (Matériel et méthodes 2.4.2.1).

3.2.1.2) Résultats

Les cellules contrôles ne présentent pas d'autofluorescence à la longueur d'onde d'émission de la cyanine-5 après 4h et 24h de traitement par le DMEM (Figure 70.A et B) ; il en est de même pour les cellules traitées par les NPC ICONS 30. Le traitement par les NPC ICONS 36-Cy5 et 73-Cy5 entraîne l'apparition d'une fluorescence dans les bEnd.3 après 4h et 24h de traitement (Figure 70.A, B), qui semble plus importante pour les cellules traitées par les NPC ICONS 73-Cy5. La colocalisation des NPC avec les filaments d'actine indique la présence des NPC au niveau du cytoplasme des cellules.

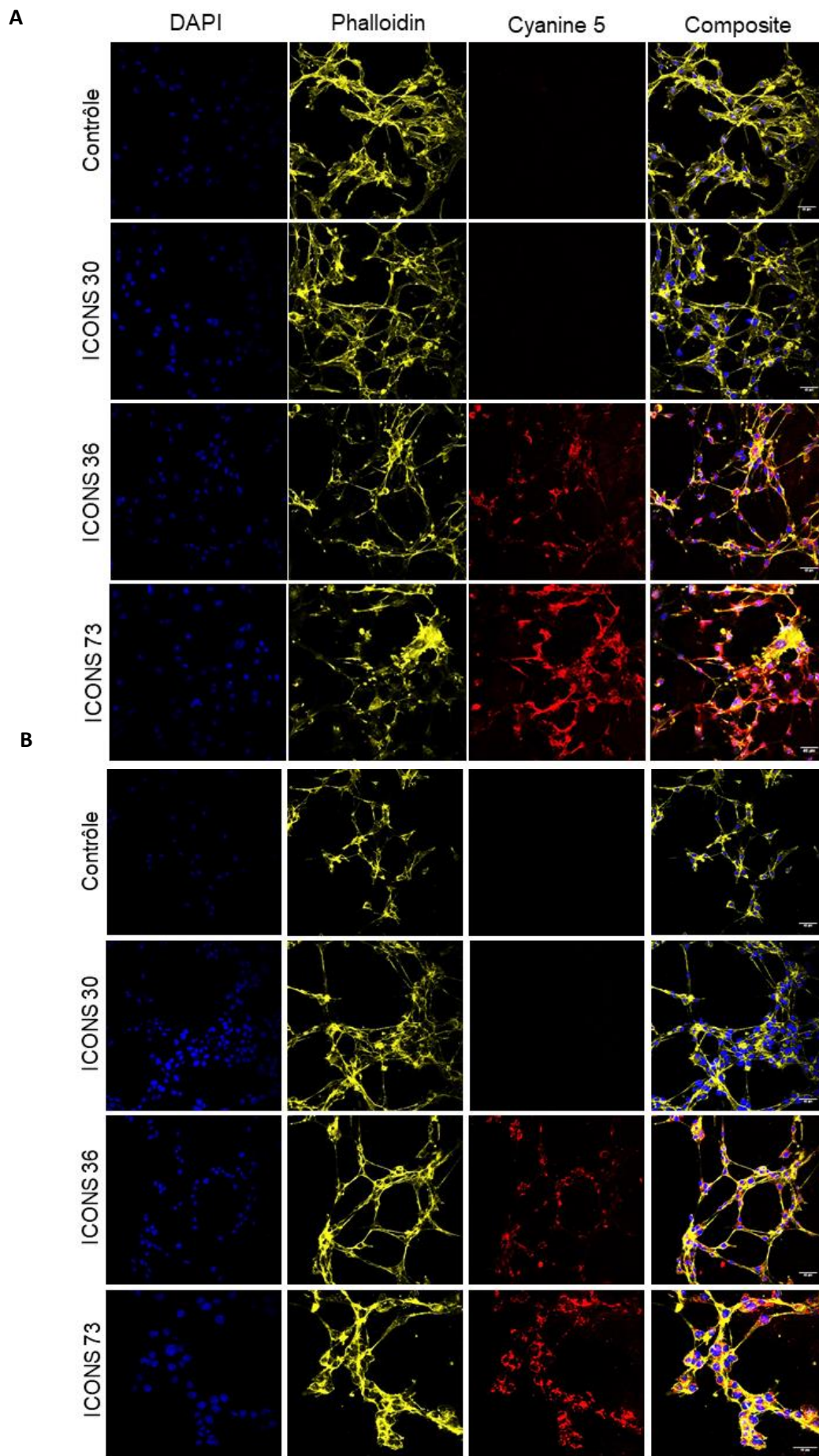


Figure 70 : Internalisation et localisation des NPC par microscopie confocale (objectif 20X) à 4 h (A) et 24h (B). Les noyaux sont marqués par le DAPI en bleu, les filaments d'actine par la phalloïdine en jaune et les NPC par la cyanine 5 en rouge.

Les acquisitions réalisées à plus fort grossissement permettent de confirmer la localisation cytoplasmique des NPC ICONS 36-Cy5 et 73-Cy5 ; aucune NPC n'a été détectée au niveau nucléaire (Figure 71.)

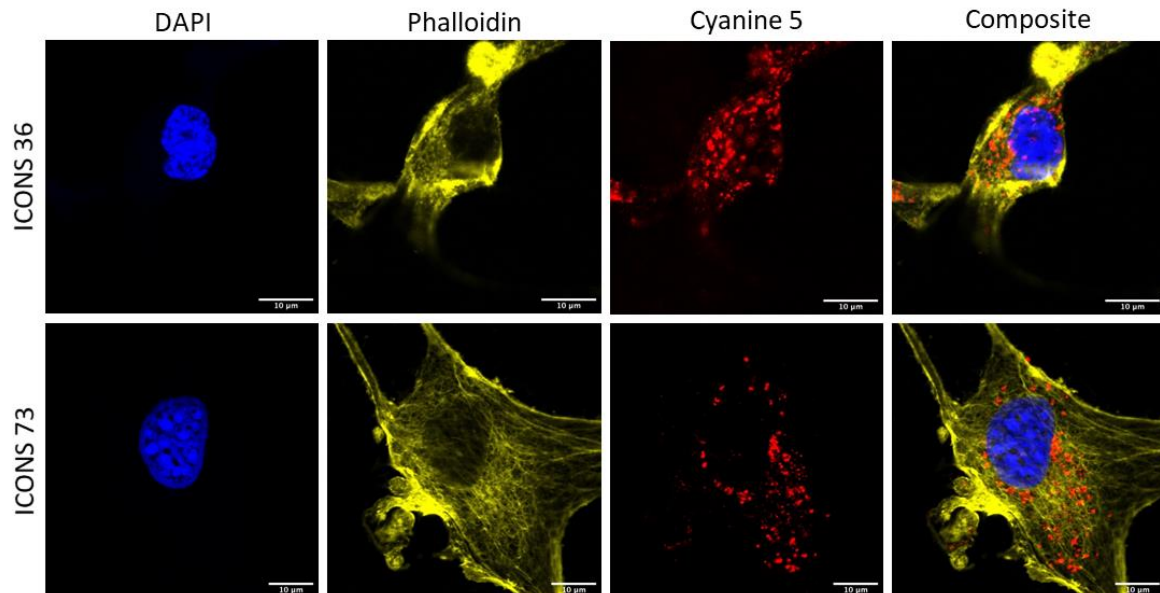


Figure 71 : Internalisation et localisation des NPC par microscopie confocale à 24h (objectif 63X). Les noyaux sont marqués par le DAPI en bleu, les filaments d'actine par la phalloïdine en jaune et les NPC par la cyanine 5 en rouge.

3.2.1.3) Discussion

Nos résultats mettent en évidence la présence et l'internalisation de NPC au sein des cellules bEnd.3.

D'autres articles ont étudié la localisation des NPC en utilisant des NPC couplées à un fluorophore (Bao et al., 2018; Gao et al., 2013; Hirst et al., 2013; Mazzolini et al., 2016; Portioli et al., 2013; Qiu et al., 2015; Singh et al., 2010; Xia et al., 2008). Toutes les études ont mis en évidence une localisation des NPC uniquement dans le cytoplasme, ce qui est en accord avec nos données (Bao et al., 2018; Gao et al., 2013; Mazzolini et al., 2016; Qiu et al., 2015; Singh et al., 2010; Xia et al., 2008). Seule une étude a présenté une localisation nucléaire des NPC (Singh et al., 2010). Cette absence de NPC dans le noyau pourrait expliquer les plus faibles capacités antioxydantes des NPC sur les acides nucléiques dont notamment l'ADN que nous avons observées précédemment grâce à l'immunofluorescence de la 8-OHdG.

Certaines de ces études ont démontré des colocalisations subcellulaires des NPC avec différents organites. Deux études ont mis en évidence une co-localisation uniquement avec les endosomes

(Gao et al., 2013; Xia et al., 2008). L'article de Qiu et coll. (2015) a suggéré une colocalisation avec les lysosomes et les endosomes (Qiu et al., 2015). Enfin, une étude a présenté des colocalisations avec les mitochondries, les lysosomes et le réticulum endoplasmique (Singh et al., 2010). Cette étude comporte également une cinétique d'internalisation qui montre la présence de NPC dès 1h et qui augmente jusqu'à 6h.

Ainsi, des marqueurs d'organites intracellulaires dont des marqueurs d'endosomes, de lysosomes, de peroxysomes, de mitochondrie ou de l'appareil de Golgi auraient pu être mis à profit afin de préciser la localisation subcellulaire des NPC. Pour notre part, nous avons cherché à préciser la localisation subcellulaire des NPC par microscopie électronique à transmission.

3.2.2) Localisation subcellulaire des NPC par microscopie électronique à transmission

Seules les NPC 30 et 36 ont été utilisées ici ; les NPC ICONS 73 n'étaient pas encore synthétisées au moment de cette étude et n'ont donc pas pu être testées.

3.2.2.1) Protocole

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 1 000 000 de cellules par puits dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont été traitées par les NPC ICONS 30 et 36 à 1000µg/mL pendant 24h. Les cellules ont ensuite été lavées puis fixées, déshydratées et incluses avant d'être observées par microscopie électronique à l'université Paris Diderot (Matériel et méthodes 2.4.2.2).

3.2.2.2) Résultats

Les images de microscopie électronique à transmission confirment la présence des NPC ICONS 36 au niveau cytoplasmique, autour du noyau ; les NPC sont en revanche absentes au niveau nucléaire. A plus fort grossissement, les NPC apparaissent localisées au niveau des endosomes périnucléaires (Figure 72). Les NPC ICONS 30 étaient également présentes dans les endosomes périnucléaires mais en quantité plus faible (Données non présentées).

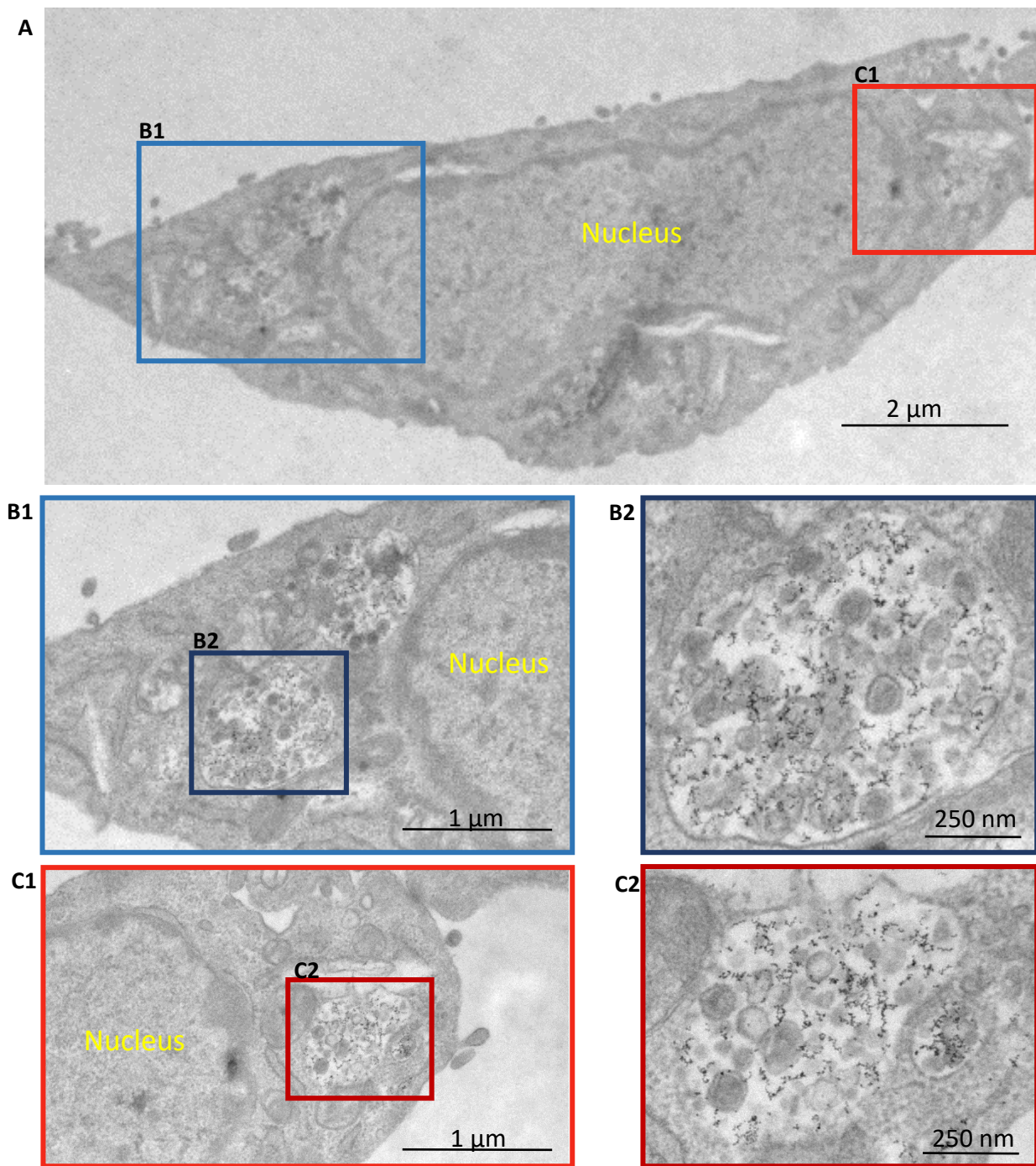


Figure 72 : Localisation subcellulaire des NPC par microscopie électronique à transmission chez des cellules bEnd.3 traitées par des NPC ICONS 36 (1000μg/mL) après 24h d'incubation. Visualisation de la cellule entière (A) et grossissement progressif sur deux endosomes (B1-2 et C1-2). Grossissement : x 10 500 (A), x 19 000 (B1 et C1) et x 48 000 (B2 et C2).

3.2.2.3) Discussion

L'internalisation des NPC dans les endosomes cytoplasmiques observée ici confirme les données obtenues par microscopie confocale à fluorescence.

La plupart des études ont utilisé la microscopie électronique à transmission afin de caractériser la forme et la taille des NPC en milieu acellulaire ; seules quelques-unes ont mis à profit cette technique pour étudier l'internalisation des NPC (Gao et al., 2013; Hirst et al., 2013; Horie et al., 2011; Mazzolini et al., 2016; Pagliari et al., 2012; Qiu et al., 2015). Toutes ces études ont montré, comme nous, la localisation des NPC exclusivement dans le cytoplasme, et plus précisément dans des vésicules cytoplasmiques (endosomes, lysosomes, phagosomes). Une étude sur des kératinocytes a confirmé la présence de NPC libres dans le cytoplasme ou agrégées dans des phagosomes (Horie et al., 2011). Deux études ont confirmé la présence de NPC au niveau des endosomes, respectivement sur des cellules épithéliales (Mazzolini et al., 2016) ou embryonnaires rénales (Qiu et al., 2015). L'étude de Gao et coll. publiée en 2013 réalisée sur des macrophages et des cellules de gliomes a confirmé la présence de NP dans les endosomes mais également dans des macropinosomes et des phagosomes, proches de la membrane cellulaire (Gao et al., 2013). Enfin, seule une étude réalisée sur des progéniteurs cardiaques a suggéré la présence de NPC libres dans le cytoplasme (Pagliari et al., 2012).

Par ailleurs, certaines études ont recherché les mécanismes permettant l'internalisation des NP et des NPC dans les endosomes dont les principaux sont présentés dans la Figure 73. Une étude, sur d'autres NP suggère que l'endocytose est la principale voie par laquelle les NP sont internalisées dans les cellules (Gao et al., 2013). De plus, cet article a montré que, parmi les différents mécanismes, l'endocytose médiée par la clathrine et la micropinocytose étaient prépondérantes. De plus, l'étude de Qiu et coll. confirme ces données en démontrant une colocalisation entre les NPC et les endosomes/lysosomes et une diminution de l'internalisation par l'azide de sodium soulignant un mécanisme énergie-dépendant (Qiu et al., 2015).

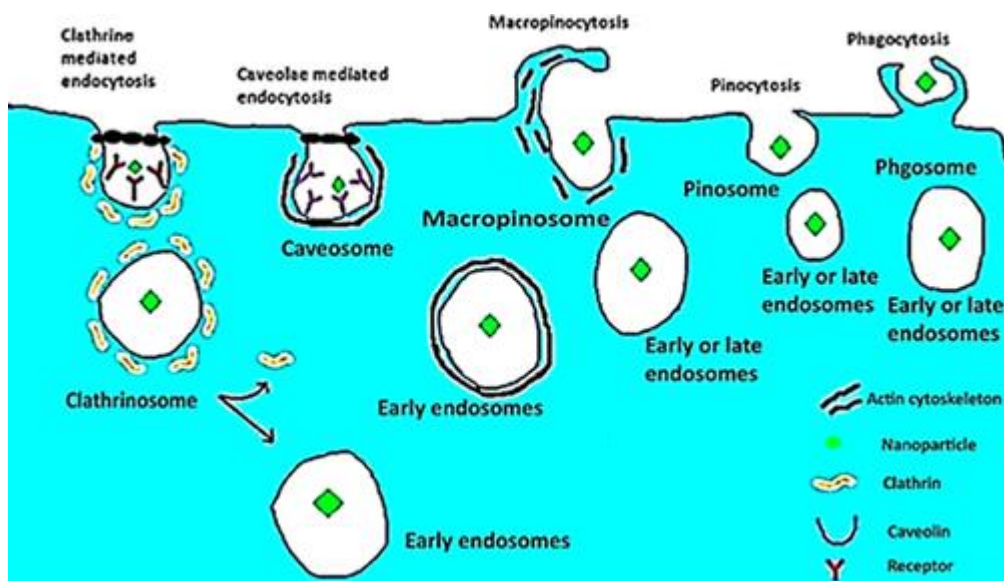


Figure 73 : Principales voies d'endocytose des nanoparticules. D'après Salatin Sara, 2018.

L'absence de NPC dans les mitochondries mise en évidence avec la TEM pourrait expliquer les faibles capacités des NPC à limiter la production mitochondriale d'anion superoxyde observée avec le MitoSoxRed.

En conclusion, l'ensemble des techniques mises en œuvre dans cette partie permet de conclure à l'internalisation de nos NPC qui se localisent dans les endosomes périnucléaires.

3.3) Ciblage de VCAM-1 par les NPC dans les cellules bEnd.3

Différentes expériences ont été conduites afin de démontrer la fixation spécifique de nos NPC ciblant sur la molécule VCAM-1 des cellules bEnd.3. VCAM-1 est constitutivement exprimée dans les cellules bEnd.3 (Böggemeyer et al., 1994; Close et al., 2013; Gosk et al., 2008; Henseleit et al., 1994; Park et al., 2009) et peut être surexprimée par diverses stimulations telles que le traitement par le LPS (Böggemeyer et al., 1994; Henseleit et al., 1994), le TNF (Gosk et al., 2008; Henseleit et al., 1994), l'IL-1 (Henseleit et al., 1994), l'IFN γ (Henseleit et al., 1994), le cadmium (Park et al., 2009).

Le potentiel ciblant de nos NPC ICONS 36 et 73 sur lequel le peptide reconnaissant VCAM-1 a été greffé a tout d'abord été évalué en condition physiologique, puis dans un modèle de surexpression de VCAM-1 qui a nécessité une mise au point préalable.

3.3.1) Localisation des NPC ciblantes par microscopie à fluorescence

Dans un premier temps le potentiel ciblant des NPC fonctionnalisées par le peptide a été apprécié par microscopie à fluorescence afin d'estimer la quantité de NPC internalisées/ fixées aux cellules et d'évaluer leur localisation.

3.3.1.1) Protocole

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 200 000 cellules par puits sur des lamelles en verre dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées par les NPC ICONS 36-Cy5-Scramble ou ICONS 36-Cy5-Peptide à 100µg/mL pendant 60 minutes. Après traitement, les cellules sont lavées, afin d'éliminer les NPC non liées aux cellules, puis fixées par du paraformaldéhyde à 4% pendant 10 minutes. Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine A488 au 1/50^{ème} pendant 15 minutes et les noyaux sont marqués par le DAPI à 0,1µg/mL pendant 5 minutes. Les lames sont observées au microscope confocal Leica (Matériel et méthodes 2.4.2.1).

3.3.1.2) Résultats

Les acquisitions et traitement d'images ont été réalisés dans les mêmes conditions (durée d'acquisition, gain et seuil sur Image J). Le signal de fluorescence est très faible dans les cellules traitées pendant 60 minutes par les NPC non ciblantes (NPC ICONS 36 – Cy5 – scramble, Figure 74 A et B) et le signal de fluorescence semble plus important dans les cellules traitées par les NPC ciblantes (NPC ICONS 36 – Cy5 – Peptide, Figure 74 A et B). Les acquisitions réalisées à l'objectif 63x (Figure 74 B) mettent en évidence une localisation intracellulaire et membranaire.

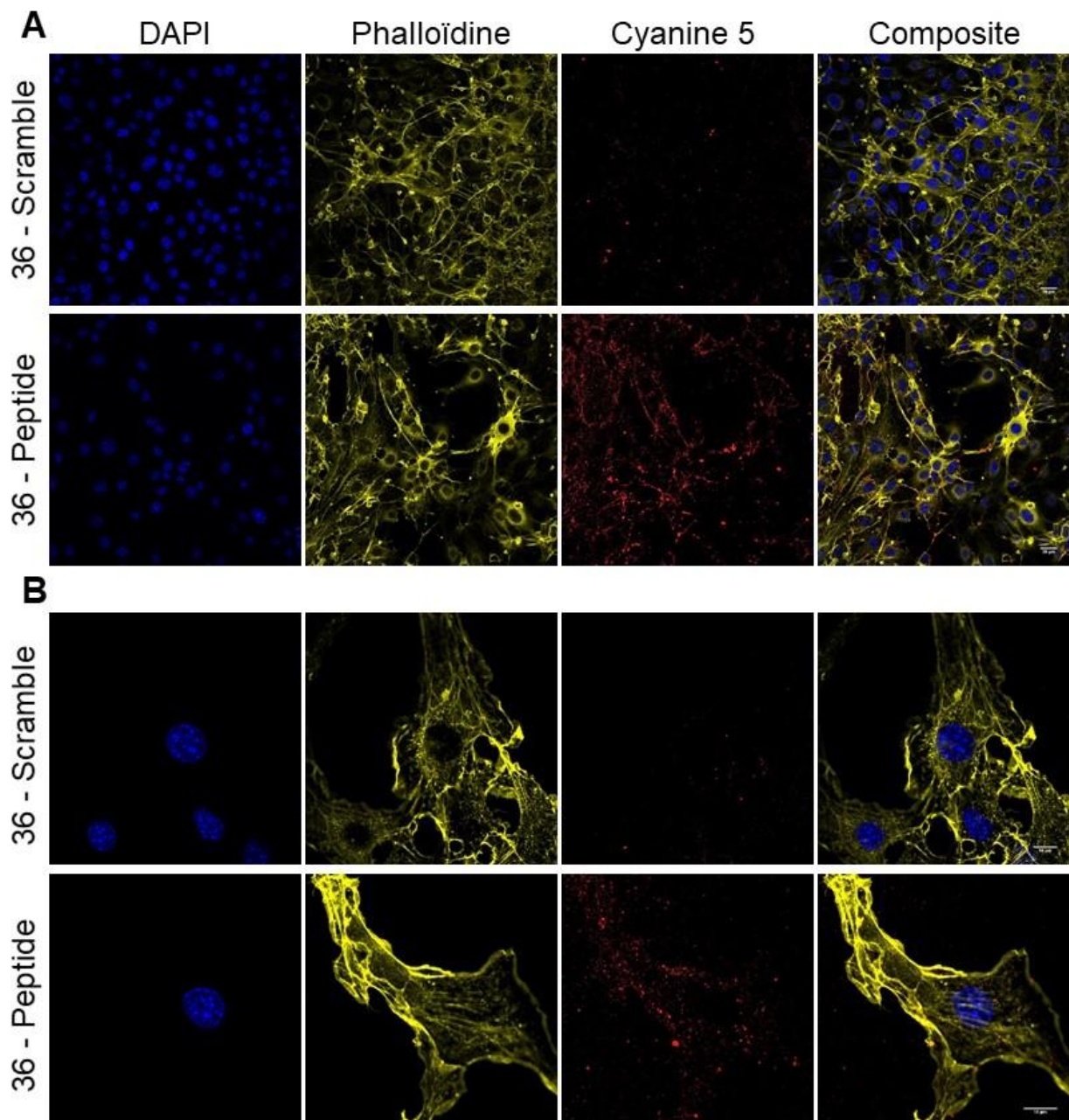


Figure 74 : Internalisation et localisation des NPC ciblant par microscopie confocale.

Les cellules bEnd.3 ont été traitées par les NPC ICONS 36 – Cy5 – scramble et ICONS 36 – Cy5 – peptide pendant 60 minutes. Les noyaux sont marqués par le DAPI en bleu, les filaments d'actine par la phalloïdine en jaune et les NPC par la cyanine 5 en rouge (A : objectif 20X ; B : objectif 63X).

3.3.1.3) Discussion

Dans cette étude, les NPC ciblant et non ciblant n'ont été incubées que 60 minutes : en effet, nous avons vu précédemment que dès 4 h de traitement par les NPC, plus de 95% des cellules étaient marquées. Pour pouvoir observer d'éventuelles différences entre les deux types de NPC, nous avons

donc réduit la durée du traitement. Le signal de fluorescence semble plus important après traitement par les NPC ciblant (NPC ICONS 36 – Cy5 – peptide) par rapport aux NPC non ciblant (NPC ICONS 36 – Cy5 – scramble). Deuxième point intéressant, la localisation des NPC ciblant semble être plutôt membranaire et non périnucléaire. En effet, les données obtenues avec les NPC fonctionnalisés par la cyanine uniquement (Résultats 3.2 - Localisation intracellulaire des NPC) mettaient en évidence une localisation cytoplasmique périnucléaire qui n'est pas retrouvée avec les NPC ciblant.

Ces résultats pourraient souligner l'affinité des NPC ciblant pour VCAM-1, exprimé dans les cellules bEnd.3. Cependant, d'autres techniques sont nécessaires pour confirmer ces hypothèses telles qu'une colocalisation entre VCAM-1 et les NPC dans un premier temps. Puis des données quantitatives seront nécessaires, qui peuvent être obtenues par cytométrie en flux ou ELISA.

Une étude a utilisé des liposomes ciblant VCAM-1 par un anticorps anti-VCAM-1 (M/K-271) et a démontré la spécificité du ciblage par colocalisation avec un marqueur endothélial (CD31) en immunofluorescence (Gosk et al., 2008)

Cependant, un ligand peptidique présente plusieurs avantages destinés à résoudre les inconvénients de leurs homologues protéiques (anticorps, ligands naturels) dont leur plus faible coût de production, leur moindre antigénicité et également leur taille plus petite (Burtea C, 2009). Le dernier point est particulièrement intéressant dans le cadre des NPC, en effet la taille moyenne des anticorps est d'environ 10nm (Reth M, "Matching cellular dimensions with molecular sizes"), ce qui pourrait augmenter le diamètre des NPC de 20nm.

D'autres équipes ont fonctionnalisés des NPC avec une molécule (Asati et al., 2009; Bao et al., 2018) ou un anticorps (Cimini et al., 2012; Yun et al., 2013) afin de les rendre ciblant et ont pu valider la spécificité de leurs ciblage. Une étude a développé des NPC ciblant les récepteurs folates des cellules cancéreuses grâce à l'acide folique et a validé la spécificité du ciblage par ELISA (Asati et al., 2009). Une autre étude a utilisé des NPC ciblant les plaques β -amyloïdes par un anticorps et a confirmé la spécificité du ciblage par une colocalisation entre les NPC et les plaques A β (Cimini et al., 2012). Enfin, une équipe a utilisé l'angiopé-2 afin de cibler les récepteurs LRP de la BHE et augmenter la transcytose, ils ont pu valider la spécificité de leurs NPC par immunofluorescence et cytométrie en flux (Bao et al., 2018).

Hormis les NPC, l'équipe de Yun et coll. a fonctionnalisés des NP (liposomes, ou NP de PBCA [polybutylcyanoacrylate] et PLGA [poly(lactide-co-glycolide)]) par un anticorps NR1 pour cibler les récepteurs NMDA et a démontré dans un modèle murin d'ischémie cérébrale que 1% de la dose

injectée était retrouvé dans le cerveau pour les NP non ciblantes et ce taux était supérieur à 2% avec les NP ciblantes (Yun et al., 2013).

Nos données obtenues dans des conditions « physiologiques » semblant montrer une plus grande fixation des NPC ciblantes aux cellules bEnd.3, nous avons par la suite développé un modèle cellulaire de surexpression de VCAM-1 afin de conforter ces résultats.

3.3.2) Mise au point d'un modèle de surexpression de VCAM-1

3.3.2.1) Protocole

L'expression de VCAM-1 est augmentée par divers agents pro-inflammatoires dont le LPS (Lee et al., 2017; Rafiee et al., 2016; Sawa et al., 2008), notamment dans les cellules bEnd.3 (Böggemeyer et al., 1994; Henseleit et al., 1994). Ainsi, le LPS a été choisi pour induire la surexpression de VCAM-1 dans les cellules bEnd.3. Deux techniques complémentaires ont été utilisées : la cytométrie en flux afin d'obtenir des données quantitatives et la microscopie à fluorescence pour acquérir des données qualitatives.

Les cellules bEnd.3 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 200 000 cellules par puits sur des lamelles en verre (pour la microscopie à fluorescence uniquement) dans du milieu DMEM et cultivées pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées par du DMEM (cellules contrôles) ou par le LPS à 10 ou 50µg/mL pendant 24h (Matériel et méthodes 2.4.3.2).

- Cytométrie en flux : Après les traitements, les cellules sont lavées 3 fois par du PBS, détachées des puits par 200 µL de trypsine puis centrifugées à 100g pendant 5 minutes. Les cellules sont reprises dans 500µL de PBS – BSA 0,5% (ID Bio, 1000-70) pendant 30 minutes afin de bloquer les sites non spécifiques. L'anticorps primaire (Tableau XXI) est incubé pendant 30 minutes à 4°C, les cellules sont lavées 3 fois puis l'anticorps secondaire (Tableau XXI) est incubé pendant 30 minutes 4°C. La fixation/internalisation est quantifiée par cytométrie en flux aux longueurs d'ondes d'excitation de 640nm et d'émission de 660nm (Millipore Guava Easy Cyte Ds200).

- Microscopie à fluorescence : Après incubation avec les NPC, les cellules sont lavées 3 fois par du PBS, fixées par du PFA à 4% (ACROS, 169650025) avec 0,5% de Triton X100 (Sigma, 516813) durant 12 minutes, puis lavées 3 fois à nouveau. Les sites non spécifiques sont bloqués par du PBS – sérum de chèvre 5% (Sigma, G9023 – Lot SCBL5146V) pendant 30 minutes. L'anticorps primaire (Tableau XXI) est incubé toute la nuit à 4°C et l'anticorps secondaire (Tableau XXI) est incubé pendant 2h à

37°C. Les filaments d'actine sont marqués par la phalloïdine A488 au 1/50ème pendant 15 minutes (Thermofisher, A12379). Le DAPI (Merck Millipore, 268298) à 0,1mg/mL est dilué au 1/1000 dans du PBS et incubé 5 minutes sur les cellules. Les images sont prises au microscope à épifluorescence (Zeiss Axiophot, Marly le Roi, France) à une longueur d'onde de 550nm.

Tableau XXII : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la mise au point du modèle de surexpression de VCAM-1.

| Anticorps primaires | | | | |
|---|--------------------|------------------------|------------------|------------------|
| Fournisseur | Espèce | Dilution | Référence | |
| Abcam | Lapin anti-souris | 1/50ème | 134047 | |
| Biorad | Rat anti-souris | 1/50ème | MCA2297 | |
| Anticorps secondaires (Cytométrie en Flux) | | | | |
| Ac primaire ciblé | Fournisseur | Espèce | Dilution | Référence |
| Abcam | Thermofisher | Chèvre anti-lapin A488 | 1/100ème | A 11 008 |
| Biorad | Thermofisher | Chèvre anti-rat A488 | 1/100ème | A 11 006 |
| Anticorps secondaires (Microscopie à fluorescence) | | | | |
| Abcam | Thermofisher | Chèvre anti-lapin A555 | 1/500ème | A 27 039 |
| Biorad | Thermofisher | Chèvre anti-rat A555 | 1/500ème | A 21 434 |

3.3.2.2) Résultats

En condition contrôle, $6,4 \pm 0,3\%$ des cellules présentent un marquage VCAM-1 avec l'anticorps primaire Abcam et $11,6 \pm 1,1\%$ avec l'anticorps primaire Biorad (Figure 75 A et B). Le LPS n'augmente pas le nombre de cellules exprimant VCAM-1 détecté par l'anticorps Abcam : $12,0 \pm 1,2\%$. En revanche, avec l'anticorps Biorad, le LPS augmente significativement d'un facteur 2,8 le pourcentage de cellules exprimant VCAM-1 ($17,7 \pm 0,5\%$; $P < 0,001$; Figure 75 B).

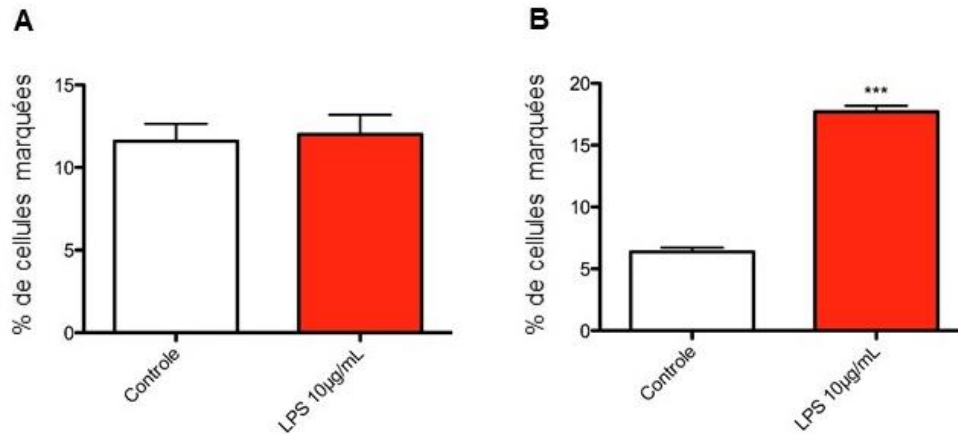


Figure 75 : Pourcentage de cellules bEnd.3 exprimant VCAM-1 en condition physiologique (contrôle) ou après traitement par le LPS à 10µg/mL. (A) Anticorps primaire anti-VCAM-1 Abcam au 1/50^{ème} (Lapin anti-souris) et anticorps secondaire chèvre anti-lapin A488 au 1/100^{ème}. (B) Anticorps primaire anti-VCAM-1 Biorad au 1/50^{ème} (Rat anti-souris) et anticorps secondaire chèvre anti-rat A488 au 1/100^{ème}. Les résultats sont exprimés en % de cellules marquées. Les données sont exprimées en moyenne ± ESM (n=3). Test t de Student, *** P < 0,001.

Concernant la microscopie à fluorescence, l'anticorps primaire Abcam (Figure 76 A) met en évidence une importante expression de VCAM-1 dans le cytoplasme et les noyaux des cellules bEnd.3 (colocalisation avec le DAPI), que ce soit en condition physiologique ou après traitement par le LPS à 10 et 50µg/mL (Figure 76 A). De plus, toute la population cellulaire semble exprimer VCAM-1 (Figure XX A).

Une très faible expression de VCAM-1 est observée après incubation de l'anticorps Biorad en condition physiologique (Figure 76 B). L'expression de VCAM-1 est nettement augmentée après traitement par le LPS à 10 et 50µg/ mL (Figure 76 B). De plus, après traitement par le LPS, toutes les cellules n'expriment pas VCAM-1 (Figure 76 B). Enfin, la localisation de VCAM-1 est principalement cytoplasmique, bien qu'une co-localisation entre les noyaux (DAPI) et VCAM-1 soit observée dans quelques cellules (Figure 76 B).

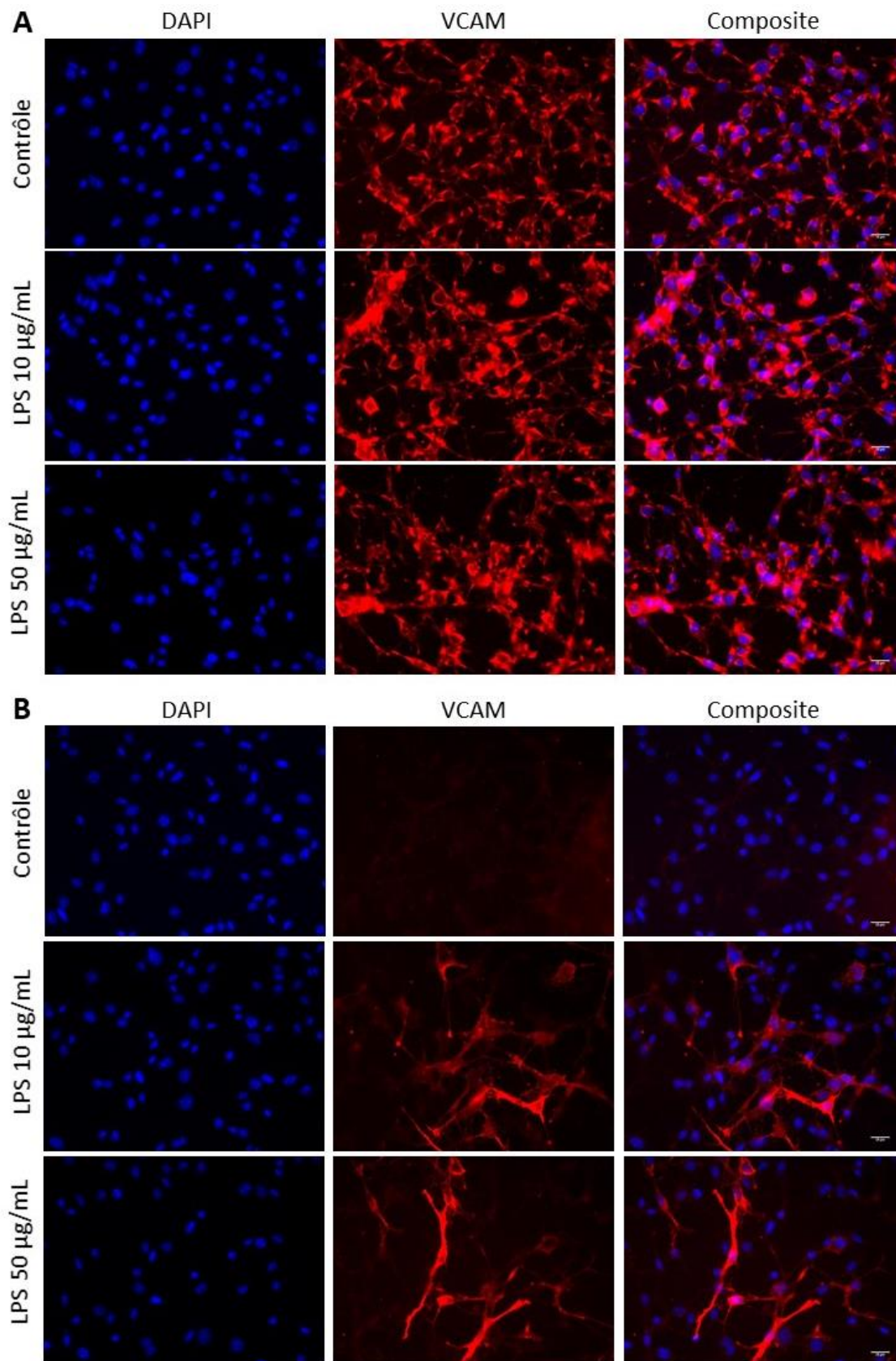


Figure 76 : Expression de VCAM-1 dans les cellules bEnd.3 en condition physiologique (contrôle) ou après traitement par le LPS à 10µg/mL et 50µg/mL. (A) Anticorps primaire anti-VCAM-1 Abcam au 1/50^{ème} (Lapin anti-souris) et anticorps secondaire chèvre anti-lapin A488 au 1/100^{ème}. (B) Anticorps

primaire anti-VCAM-1 Biorad au 1/50^{ème} (Rat anti-souris) et anticorps secondaire chèvre anti-rat A488 au 1/100^{ème}. Les noyaux sont marqués par le DAPI en bleu, les filaments d'actine par la phalloïdine en jaune et les NPC par la cyanine 5 en rouge. Les images sont prises au microscope à épifluorescence (Zeiss Axiophot, Marly le Roi, France) à une longueur d'onde de 550nm.

3.3.2.3) Discussion

L'expression constitutive de VCAM-1 au sein des cellules bEnd.3 ne fait pas consensus : certaines études ont démontré une expression physiologique de VCAM-1 par RT-PCR (Lee et al., 2017), RT-qPCR (Close et al., 2013; Lee et al., 2017), Western Blot (Lee et al., 2017; Sun et al., 2019b) ou par cytométrie en flux (Gosk et al., 2008; Henseleit et al., 1994; Wojkowska et al., 2017) alors que d'autres n'ont pas démontré cette expression par IHC (Böggemeyer et al., 1994) et immunofluorescence (Park et al., 2009). Ainsi, les techniques quantitatives (RT-qPCR, Western Blot et cytométrie) ont démontré une expression physiologique de VCAM-1 dans les cellules bEnd.3, tandis que les techniques semi-quantitatives (IHC et IF) n'ont pas mis en évidence cette expression dans les bEnd.3. Pour ces deux dernières techniques, on ne peut exclure que l'acquisition ait été réglée afin de ne pas obtenir de signal dans les cellules en condition physiologique afin de souligner la surexpression de VCAM-1 en condition inflammatoire. Quoi qu'il en soit, les études les plus récentes semblent s'accorder sur l'expression physiologique de VCAM-1 dans les bEnd.3 (Lee et al., 2017; Sun et al., 2019b; Wojkowska et al., 2017). L'étude de Lee BK et coll. publiée en 2017 a notamment démontré la présence de VCAM-1 en condition physiologique par de nombreuses techniques : RT-PCR ; RT-qPCR, Western Blot et immunofluorescence (Lee et al., 2017).

L'expression de VCAM-1 en condition inflammatoire au contraire fait consensus dans la littérature. Dans les cellules bEnd.3, de nombreuses conditions inflammatoires augmentent l'expression de VCAM-1, mesurée par différentes techniques. Le LPS induit une augmentation de l'expression de VCAM-1 évaluée par immunohistochimie (Böggemeyer et al., 1994) ou quantifiée par cytométrie en flux (Henseleit et al., 1994). Une étude a mis en évidence une augmentation de l'expression de VCAM-1 induite par le LPS à 10µg/mL par de nombreuses techniques : RT-PCR, RT-qPCR et Western Blot (Lee et al., 2017). Le TNF stimule également l'expression de VCAM-1, quantifiée par cytométrie en flux (Gosk et al., 2008; Henseleit et al., 1994; Wojkowska et al., 2017). L'IFN γ et l'IL-1 augmentent également l'expression de VCAM-1 quantifiée par cytométrie (Henseleit et al., 1994). Enfin, une récente étude a mis en évidence une augmentation de l'expression de VCAM-1 évaluée par Western Blot dans les cellules bEnd.3 soumises à une OGD (Déprivation en glucose et oxygène ; Sun et al. 2019). Ces données démontrent la capacité des cellules bEnd.3 à surexprimer VCAM-1 en condition inflammatoire et ischémique.

Concernant nos études, nos données semblent contradictoires entre les deux anticorps testés au sein de chaque technique (cytométrie et microscopie). Pour la technique de cytométrie, l'expression de VCAM-1 n'est pas augmentée en présence de LPS à 10µg/mL pour l'anticorps d'Abcam tandis qu'elle augmente significativement d'un facteur 2,8 dans les mêmes conditions avec l'anticorps de Biorad. Concernant la microscopie, la même problématique est observée. Le marquage par l'anticorps d'Abcam démontre une importante expression de VCAM-1 qui n'est pas modifiée par le LPS à 10 et 50µg/mL. A l'inverse, pour l'anticorps de Biorad, aucune expression de VCAM-1 n'est observée en condition physiologique, et l'expression de VCAM-1 augmente en condition inflammatoire induite par le traitement par le LPS à 10 ou 50µg/mL.

De plus, les données sont également contradictoires entre les deux expériences pour un même anticorps. Ainsi, avec l'anticorps primaire d'Abcam, environ 10% des cellules expriment VCAM-1 en cytométrie en flux, en condition physiologique et inflammatoire alors que les données de microscopie indiquent un pourcentage de cellules exprimant VCAM-1 proche de 100%. La même problématique est observée pour l'anticorps Biorad : les données de cytométrie indiquent une expression de VCAM-1 dans 5% des cellules en condition physiologique tandis que la microscopie ne met pas en évidence d'expression de VCAM-1 dans ces mêmes conditions.

Les images de microscopie à fluorescence présentent une colocalisation de VCAM-1 avec le noyau (rose). VCAM-1 étant une protéine membranaire, son expression nucléaire n'est pas attendue. Cela peut être expliqué par la diffusion de la fluorescence et l'utilisation de la microscopie non confocale qui induit une plus large zone de mise au point en « épaisseur » (Z). Ainsi le signal de fluorescence des membranes entourant le noyau peut diffuser et être par conséquent détecté dans le noyau. Les autres études ayant réalisé des marquages de VCAM-1 ont également mis en évidence une localisation cytoplasmique par IHC (Böggemeyer et al., 1994) ou immunofluorescence (Lee et al., 2017; Park et al., 2009). Cependant, l'étude de Lee BK et coll. publiée en 2017 présente également une colocalisation avec le noyau (Lee et al., 2017).

3.3.3) Expériences préliminaires et perspectives pour valider la spécificité des NPC ciblantes

Des expériences préliminaires ont été conduites afin de valider la spécificité du ciblage de VCAM-1 par les NPC.

- **Cytométrie en flux** : Des tests préliminaires ont été réalisés par cytométrie en flux. Les NPC ciblantes et non ciblantes ont été incubées avec les cellules bEnd.3 pendant 30 ou 60 minutes à 37°C ou 4°C afin de bloquer l'internalisation active en condition physiologique (DMEM) ou en condition inflammatoire (LPS à 10µg/mL). Malheureusement ces résultats n'ont pas été probants (données non présentées).

- **ELISA** : Une mise au point a été effectuée pour la détection de VCAM-1 par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Dans un premier temps, nous avons cherché à obtenir une courbe de calibration de VCAM-1. La protéine VCAM-1 murine et humaine a été fixée au fond des puits d'une plaque 96 puits. Les anticorps primaires et secondaires préalablement décrits ont été ajoutés. De nombreux paramètres et facteurs ont été testés et modifiés : au niveau du tampon de blocage (temps d'incubation, volume, type [sérum de chèvre ou BSA]), au niveau du tampon servant à fixer VCAM-1 au fond des puits (pH, molarité, durée d'incubation, température), au niveau de VCAM-1 (concentration), au niveau de l'anticorps primaire (concentration et référence) et au niveau de l'anticorps secondaire (concentration, type de fluorophore, type de détection : fluorescence ou luminescence).

Enfin une autre stratégie a été testée, l'ELISA « sandwich » : la fixation d'un anticorps anti primaire VCAM-1 au fond des puits, l'incubation de la protéine VCAM-1 puis l'ajout d'un second anticorps primaire anti-VCAM-1 puis d'un anticorps secondaire. Malgré toutes les conditions testées, aucune courbe de calibration correcte n'a pu être générée (données non présentées).

Ces deux techniques quantitatives n'ayant pas pu aboutir, la technique de cytométrie en flux pourrait être optimisée ou d'autres techniques pourraient être envisagées : études de colocalisation par immunofluorescence (VCAM-1 /cyanine 5) ou par co-immunoprécipitation. Concernant l'immunoprécipitation, la protéine VCAM-1 pourrait être fixée sur des billes magnétiques ou d'agarose et mise en contact avec les NPC. Après incubation et centrifugation du précipité, les NPC pourraient être détectés par mesure de la fluorescence (cyanine-5). Une absence de signal pour les NPC fonctionnalisées par le peptide scramble et un signal important pour les NPC fonctionnalisées par le peptide ciblant permettrait de valider la spécificité des NPC pour VCAM-1.

TROISIÈME PARTIE : Étude de l'effet des NPC *in vivo*

Les études « *in vivo* » ont été réalisées sur des souris mâles Swiss. Dans un premier temps, la biodistribution des NPC a été suivie sur des souris naïves par différentes techniques dont l'imagerie à fluorescence sur la souris entière et la quantification de la cyanine dans les organes. Les études de toxicité ont été conduites sur ces mêmes souris jusqu'à 1 mois après injection des NPC. Enfin, le potentiel thérapeutique des NPC a été évalué sur un modèle d'ischémie cérébrale.

Deux NPC ont été testées : Les NPC ICONS 73 qui portent des PEG 2 kDa avec des fonctions amines. Les NPC ICONS 73 ont en effet été préférées aux NPC ICONS 36 sur la base des études *in vitro* :

- Elles induisent la plus faible perturbation de l'activité métabolique (aucun effet à 4h et perturbation plus faible que les ICONS 36 à 24h (1.1.2 ; Figure 49 et 50).
- Concernant l'activité antioxydante, si les NPC ICONS 73 réduisent la production d'ERO induite par le glutamate dans les mêmes proportions que les NPC ICONS 36 (2.3.1.1 ; Tableau XIX et XX ; Figure 60 et 61), elles seules réduisent le taux d'oxydation des acides nucléiques (2.4 ; Figure 67)
- Enfin, les NPC ICONS 73 sont les seules à diminuer la production mitochondriale d'anions superoxydes induite par l'H₂O₂ (2.3.1.2 ; Figure 62).

Les NPC ICONS 30 ont été sélectionnées car elles portent des PEG de 2kDa non aminés et constituent par conséquent le meilleur contrôle pour les ICONS 73.

1) Biodistribution des NPC

Les souris ont reçu par voie intraveineuse (5µL/g, veine de la queue) une solution de NaCl 0,9% (souris contrôles), les NPC ICONS 30 ou ICONS 73-Cy5 à la dose de 5mg/kg (dose maximale testée ensuite dans le modèle d'ischémie cérébrale). Les acquisitions de fluorescence sont réalisées à différents temps et ce jusqu'à la mise à mort des animaux, 24 heures ou 1 mois après les traitements. Les organes (foie, rein, rate, poumon et cerveau) sont prélevés afin de doser la cyanine (biodistribution) ou pour les études de toxicité ultérieures.

1.1) Biodistribution des NPC par imagerie sur la souris entière

1.1.1) Protocole

Après les injections de NPC ou de sérum physiologique, les animaux sont anesthésiés et placés dans un Photon Imager. Les acquisitions sont réalisées sur le même groupe d'animaux de 5 minutes à 1 mois. Les acquisitions sont réalisées avec les souris placées sur le dos (fluorescence ventrale) ou sur le ventre (fluorescence dorsale) ; de plus, des régions d'intérêts (ROI) permettent de délimiter les organes et de quantifier l'intensité de fluorescence pour chacun d'eux. L'intensité de fluorescence est exprimée en photon/ seconde/ cm²/ stéradian (Matériel et méthodes 3.2.2). Les données sont exprimées en intensité de fluorescence (unité arbitraire, UA) à partir de la formule suivante où Tx représente le temps (x est compris entre 5 minutes et 1 mois) et T_{5min} la première acquisition.

$$\text{IF (UA)} = \frac{(\text{Intensité de fluorescence de la ROI à Tx} - \text{Intensité de fluorescence de la ROI contrôle à Tx}) / \text{Intensité de Fluorescence de la ROI à T}_{5\text{min}}}{\text{Intensité de fluorescence du standard cyanine à Tx}}$$

1.1.2) Résultats

La méthodologie de l'étude de biodistribution dont la détermination des régions d'intérêts (ROI) et des exemples représentatifs de l'évolution de la fluorescence de la cyanine-5 au niveau du ventre des souris de 5 minutes à 14 jours sont présentés sur la figure 77. Une intensité de fluorescence négligeable est observée chez les souris contrôles (Figure 77 C) ; cette fluorescence, considérée comme bruit de fond, est retranchée à l'intensité de fluorescence mesurée pour les souris traitées par les NPC ICONS 30 et 73-Cy5. L'intensité de fluorescence est également négligeable chez les souris traitées par les NPC ICONS 30, contrairement aux souris recevant les NPC ICONS 73-Cy5 (Figure 77 C).

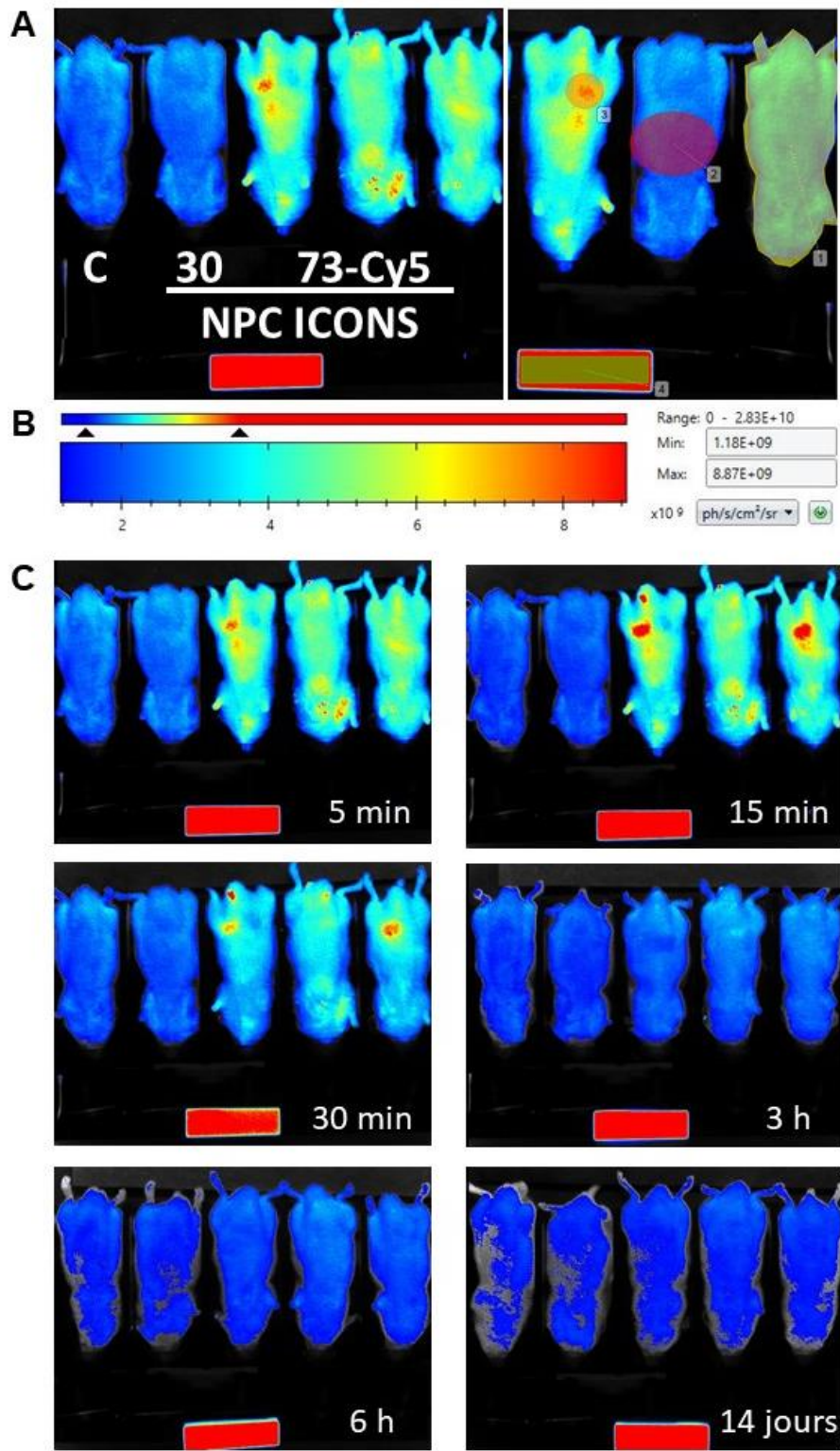
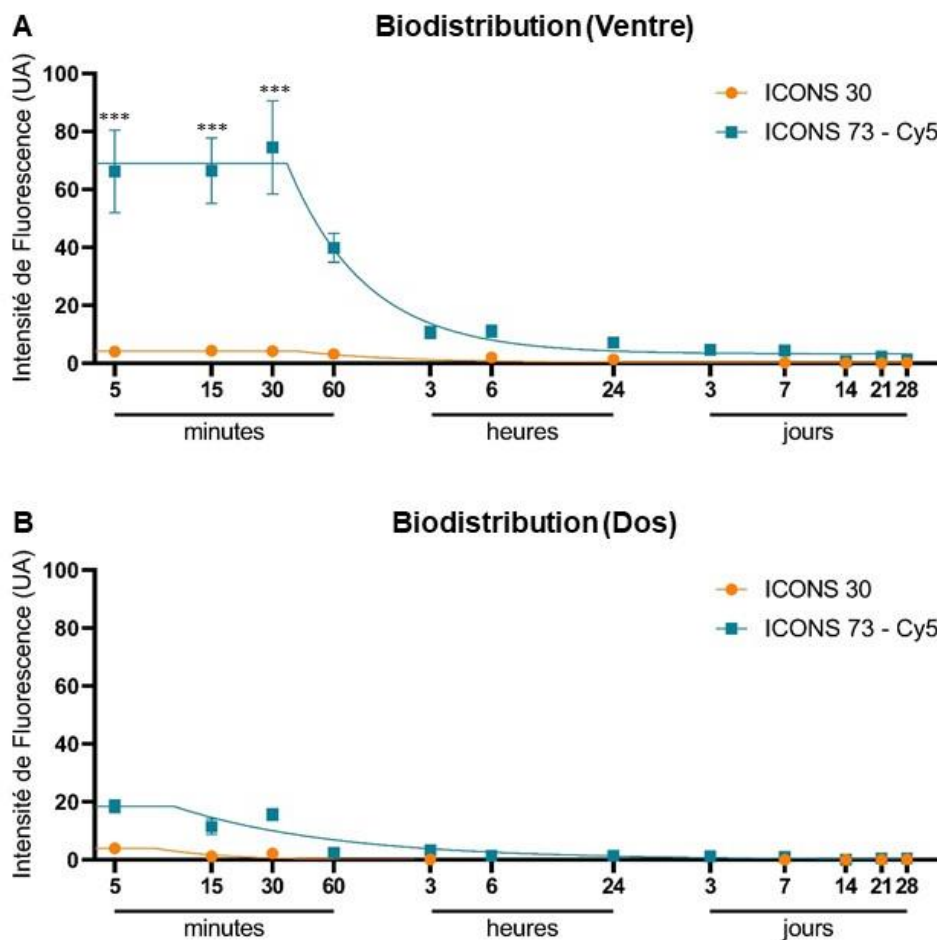


Figure 77 : Méthodologie et évolution de la biodistribution des NPC ICONS 30 et ICONS 73-Cy5 (5mg/kg) chez la souris. (A – gauche) Exemple d’acquisition, de gauche à droite : Souris contrôlée traitée par du sérum physiologique, souris traitée par les NPC ICONS 30 et souris traitée par les NPC ICONS 73-cy5 (x3). (A – droite) Délimitations des régions d’intérêts (ROI) pour la souris sur le dos (fluorescence ventrale), 1 : souris entière, 2 : Foie ; 3 : Vessie et 4 : Standard Cyanine. (B) : Echelle d’intensité de fluorescence de la cyanine 5. (C) Exemples représentatifs de l’évolution de la fluorescence de la cyanine-5 au niveau du ventre des souris de 5 minutes à 14 jours.

Concernant les acquisitions réalisées sur le ventre des souris et après quantification du signal de fluorescence (Figure 78.A), l'intensité de fluorescence est maximale dans les premières minutes suivant l'injection des NPC ICONS 73-Cy5 et significativement supérieure aux NPC ICONS 30 (66 ± 14 UA; 66 ± 11 UA et 75 ± 16 UA respectivement à 5, 15 et 30 minutes ; $P < 0,001$). Puis, l'intensité de fluorescence diminue rapidement dans les premières heures (40 ± 16 UA à 1h et 11 ± 1 UA à 3h). Ensuite, la quantité de fluorescence décroît lentement dans les quelques jours suivant l'injection et revient au niveau basal 14 jours après l'injection ($0,7 \pm 0,2$ UA). Ainsi, un plateau est observé pendant 35 minutes et le temps de demi-vie est de 37 minutes (Tableau XXIII).

Le même type de cinétique est retrouvé après l'injection des NPC ICONS 73-Cy5 par imagerie et quantification de la fluorescence au niveau dorsal (Figure 78.B), cependant le signal maximum détecté est 3 fois plus faible qu'au niveau ventral (18 ± 2 UA à 5 minutes) et l'élimination est plus rapide (Figure 78.B). En effet, la diminution de la fluorescence intervient dès les premières minutes (11 ± 3 UA à 15 minutes) et revient au niveau basal 60 minutes après les injections (2 ± 1 UA à 1h). Ainsi, un plateau est observé pendant 10 minutes et le temps de demi-vie est de 14 minutes (Tableau XXIII).



| ICONS 73-Cy5 | Durée du plateau | Temps de ½ vie | R ² |
|--------------|------------------|----------------|----------------|
| Ventre | 35 min | 37min | 0,6423 |
| Dos | 10 min | 14min | 0,6772 |

Figure 78 et Tableau XXIII : Evolution des concentrations des NPC ICONS 30 et ICONS 73-Cy5 (5mg/kg) chez la souris. Quantifications de la cyanine après acquisition de la fluorescence ventrale (A) et dorsale (B) des souris en fonction du temps. Les résultats bruts sont obtenus en photon/seconde/ cm²/ stéradian. Les données sont calculées à partir de la formule suivante : [(Intensité de fluorescence de la souris à Tx – Fluorescence de la souris contrôle à Tx) / Fluorescence de la souris à T 5 min] / Intensité de fluorescence de la cyanine à Tx. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ESM (n=3 pour les contrôles et NPC ICONS 30 ; n=9 pour les NPC ICONS 73-Cy5). ANOVA à 2 facteurs et test de Sidak's, *** P < 0,001 versus NPC ICONS 30.

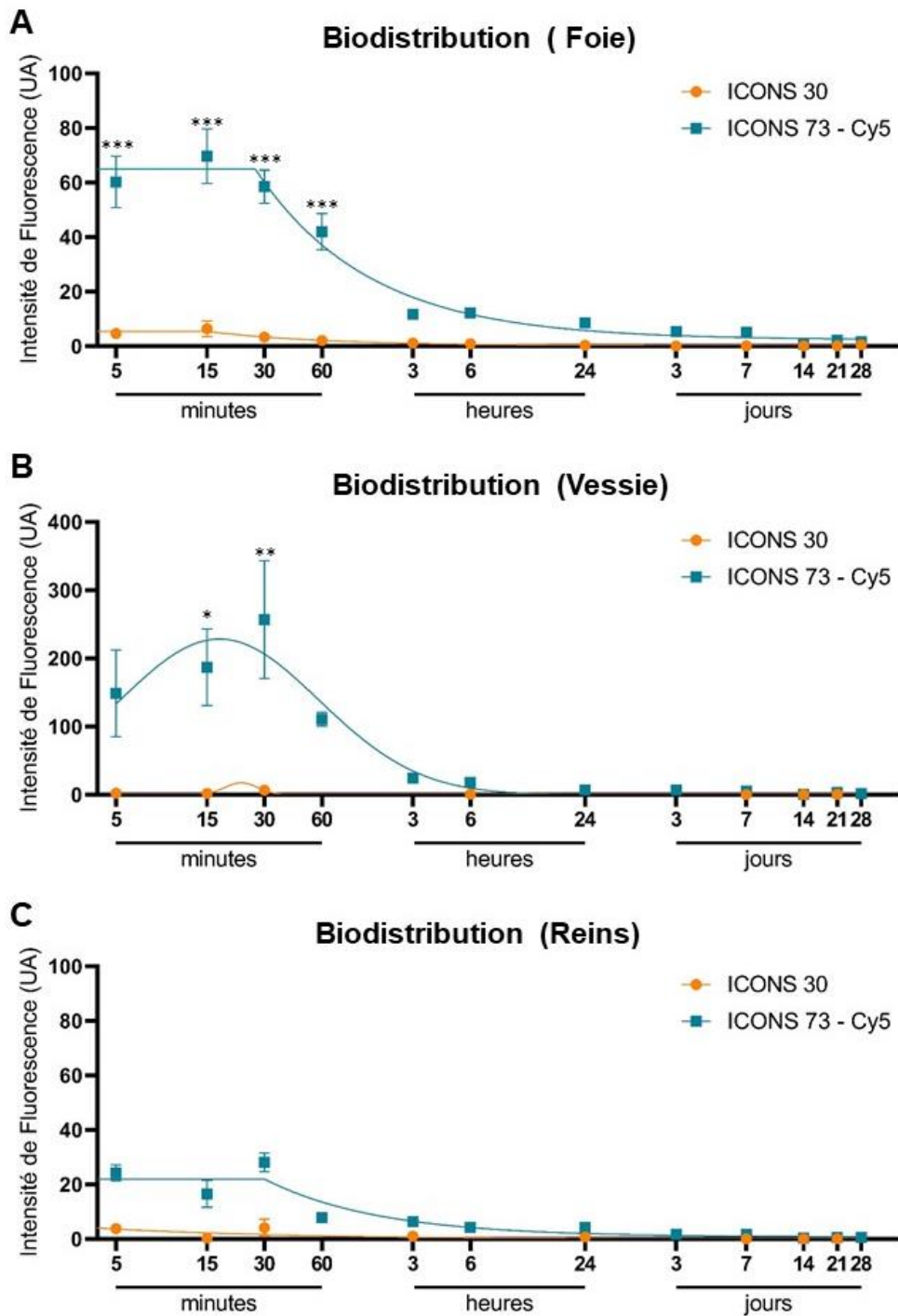
Le signal de fluorescence plus important au niveau ventral des souris suggère la présence de NPC au niveau du foie et de la rate plutôt qu'au niveau des reins (dos). Cependant, ces données sont discutables et pourraient être dues à un biais de détection. En effet, la diffusion du signal de fluorescence est plus importante dans le ventre des souris que dans le dos des souris. De plus, les profondeurs auxquelles se trouvent les organes sont différentes : plus en surface pour les organes de la face ventrale (foie, vessie, poumons) et plus en profondeur pour les organes de la face dorsale (reins), affectant ainsi le signal de fluorescence mesuré. Afin d'obtenir des informations plus précises, des ROI ont été délimitées sur différents organes dont le foie, la vessie et les reins (Figure 77 et 79).

Tous les organes analysés présentent le même type de cinétique avec un pic d'intensité de fluorescence entre 15 et 30 minutes et une diminution rapide du signal dans les premières heures, cependant les valeurs d'intensité de fluorescence varient nettement d'un organe à l'autre (Figure 79).

Concernant **le foie** (Figure 79.A), le pic de fluorescence est atteint 15 minutes après l'injection ($70 \pm 10UA$ P < 0,001). De plus, l'intensité de fluorescence des souris traitées par les NPC ICONS 73-Cy5 est significativement supérieure aux NPC ICONS 30 de 5 à 60 minutes après l'injection (P < 0,001). Puis, l'intensité de fluorescence décroît rapidement dans les premières heures ($12 \pm 2UA$ à 3 heures) et plus lentement dans les heures et jours suivants ($8 \pm 1UA$ à 24h et $5 \pm 1UA$ à 7 jours). Enfin, une quantité de fluorescence similaire au niveau basal est retrouvée 14 jours après l'injection ($0,7 \pm 0,2UA$). Ainsi, un plateau est observé pendant 27 minutes et le temps de demi-vie est de 30 minutes (Tableau XIV).

Concernant **la vessie** (Figure 79.B), le pic de fluorescence est atteint 30 minutes après l'injection et l'intensité de fluorescence y est très importante ($257 \pm 87\text{UA}$). De plus, l'intensité de fluorescence des souris traitées par les NPC ICONS 73-Cy5 est significativement supérieure aux NPC ICONS 30, 10 minutes ($P < 0,05$) et 30 minutes ($P < 0,01$) après les injections. Puis, l'intensité de fluorescence diminue rapidement dans les premières heures ($25 \pm 4\text{UA}$ à 3h) et plus lentement dans les heures et jours suivant ($7 \pm 1\text{UA}$ à 24h et $6 \pm 1\text{UA}$ à 7 jours). Enfin, l'intensité de fluorescence revient au niveau basal 14 jours après l'injection ($0,9 \pm 0,2\text{UA}$). Ainsi, un plateau est observé pendant 39 minutes et le temps de demi-vie est de 41 minutes (Tableau XIV).

Pour **les reins** (figure 79.C), le pic de fluorescence est atteint 30 minutes après l'injection ($28 \pm 3\text{UA}$), puis l'intensité de fluorescence décroît rapidement dans les premières heures ($6 \pm 1\text{UA}$ à 3h) puis revient au niveau basal 3 jours après l'injection ($1,8 \pm 0,3\text{UA}$). Ainsi, un plateau est observé pendant 30 minutes et le temps de demi-vie est de 33 minutes (Tableau XIV).



| ICONS 73-Cy5 | Durée du plateau | Temps de ½ vie | R ² |
|--------------|------------------|----------------|----------------|
| Foie | 27 min | 30min | 0,7590 |
| Vessie* | 39 min | 41min | 0,3923 |
| Reins | 30 min | 33min | 0,7071 |

* Résultats basés sur la fonction « plateau + décroissance à 1 phase » et non la fonction gaussienne représentée

Figure 79 et Tableau XXIV : Evolution des concentrations de NPC ICONS 30 et ICONS 73-Cy5 (5mg/kg) dans le foie (A), la vessie (B) et les reins (C) en fonction du temps. Les résultats bruts sont obtenus en photon/ seconde/ cm²/ stéradian. Les données sont calculées à partir de la formule suivante : [(Intensité de fluorescence de la souris à Tx – Fluorescence de la souris contrôle à Tx) / Fluorescence de la souris à T 5 min] / Intensité de fluorescence de la cyanine à Tx. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ESM (n=3 pour les contrôles et NPC ICONS 30 ; n=9 pour les NPC ICONS 73-Cy5). ANOVA 2 facteurs et test de Sidak's *** P < 0,001, ** P < 0,01, * P < 0,05 *versus* NPC ICONS 30.

1.1.3) Discussion

L'absence de fluorescence chez les souris recevant le sérum physiologique ou les NPC ICONS 30 permet de valider la spécificité de la fluorescence observée dans les souris traitées par les NPC ICONS 73-Cy5. L'élimination des NPC semble assez rapide : la majorité des NPC est en effet éliminée entre 1h et 3h, et un niveau négligeable de fluorescence est retrouvé entre 7 et 14 jours. Le signal de fluorescence plus important dans la face ventrale des souris concorde avec les ROI du foie et de la vessie. De plus, la faible valeur de fluorescence dans le dos des souris est cohérente avec les valeurs des ROI des reins. Une forte variabilité est observée pour les mesures de fluorescence dans la vessie qui peut être expliquée par le fait que certaines souris ont pu uriner avant l'acquisition. La somme de l'intensité de fluorescence des ROI des organes (foie et vessie) est supérieure à la fluorescence de la ROI sur la souris entière, ce qui peut s'expliquer par l'expression des résultats en photon/seconde/cm²/stéradian. L'aire exprimée en cm² est nettement plus importante pour la souris entière et prend en compte des régions sans aucune fluorescence, ce qui tend à diminuer les valeurs par rapport aux ROI des organes.

Dans une étude publiée en 2011, des NPC fonctionnalisées à la carboxyfluorescéine (2,5mg/kg) ont également été administrées à des souris afin de suivre leur biodistribution par imagerie (Hirst et al., 2013). Les résultats montrent la présence de NPC au niveau de la vessie, des reins et du cœur/poumon mais un signal faible au niveau du foie et de la rate ; cependant, les données d'ICP menée conjointement mettent en évidence la présence de NPC au niveau du foie et de la rate et en plus faible quantité au niveau des poumons et des reins (Hirst et al., 2013).

1.2) Quantifications des NPC dans les organes

1.2.1) Protocole

Un dosage de la cyanine a été réalisé sur les différents organes (foie, reins, rate, poumons et cerveau) des animaux utilisés pour les études de biodisponibilité et mis à mort 24 heures ou 1 mois après l'injection des NPC.

Les organes sont broyés mécaniquement par des billes en céramique dans du PBS triton-0,1% puis le volume est ajusté en fonction du poids de chaque organe, également par du PBS-triton. Les broyats sont centrifugés à 10 000g pendant 10min afin d'éliminer la fraction insoluble puis la cyanine contenue dans les surnageants est dosée au fluorimètre ($\lambda_{\text{excitation}} = 620\text{nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 670\text{nm}$). Une gamme de NPC réalisée dans les broyats d'organes de souris contrôles permet de déterminer la quantité de NPC en μg de NPC par g de tissu (Matériel et méthodes 3.2.5.1).

1.2.2) Résultats

La fluorescence mesurée dans les organes des souris traitées par les NPC ICONS 30 aux deux temps est négligeable (Figure 80. A et B), et elle est assimilée au bruit de fond.

Vingt-quatre heures après les injections (Figure 80.A), les NPC ICONS 73-Cy5 sont majoritairement retrouvées dans le foie ($33,2 \pm 1,6 \mu\text{g/g}$ de tissu, $P < 0,001$) et la rate ($29,8 \pm 1,4 \mu\text{g/g}$ de tissu, $P < 0,001$), mais également en plus faible quantité dans les reins ($3,3 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ de tissu, $P < 0,01$) et les poumons ($3,1 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ de tissu, $P < 0,05$). En revanche, une quantité négligeable de NPC ICONS 73-Cy5 est observée pour le cerveau ($0,2 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ de tissu).

Un mois après les injections (Figure 80.B), les NPC ICONS 73-Cy5 sont toujours majoritairement retrouvées dans la rate ($10,1 \pm 1,4 \mu\text{g/g}$ de tissu) et le foie ($3,2 \pm 0,6 \mu\text{g/g}$ de tissu). Une faible quantité non significative de NPC ICONS 73-Cy5 est mesurée dans les reins ($0,3 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ de tissu), une quantité négligeable est retrouvée dans les poumons ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ de tissu) et aucune trace n'a été détectée dans le cerveau ($0 \pm 0 \mu\text{g/g}$ de tissu). De plus, la quantité de NPC ICONS 73-Cy5 dans le foie et la rate diminue significativement par rapport à 24h ($P < 0,001$).

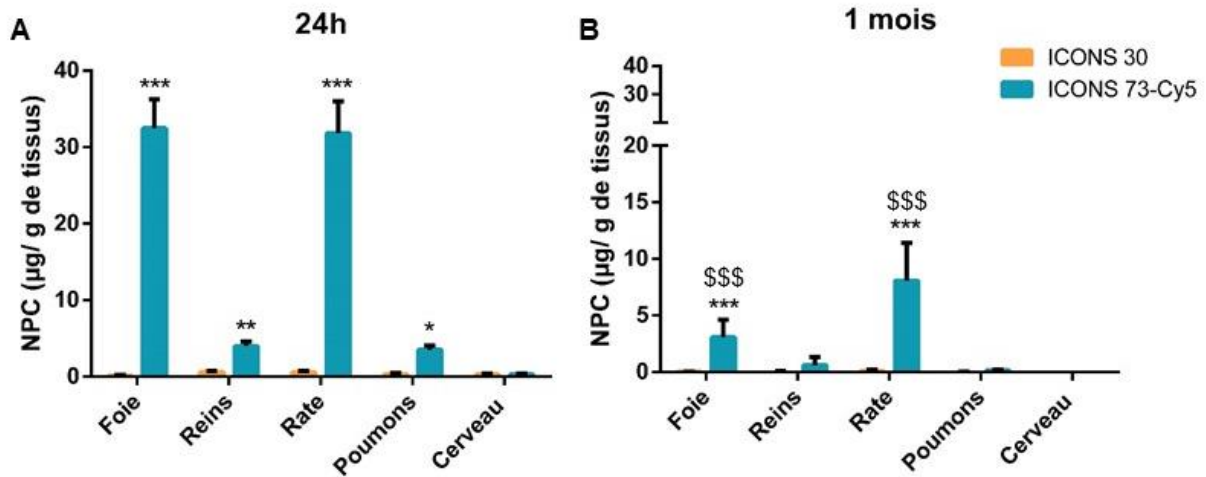


Figure 80 : Biodistribution des NPC ICONS 30 et ICONS 73-Cy5 à 5mg/kg dans les organes de souris (Foie, Reins, Rate, Poumons, Cerveau). Les organes sont prélevés 24h (A) ou 1 mois (B) après l'injection de NPC. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ESM (n=6). ANOVA 2 facteurs et test de Sidak's, *** P < 0,001, ** P < 0,01, * P < 0,05 versus « NPC ICONS 30 » et \$\$\$ P < 0,001 versus « 24h ».

Les données du foie et des reins des NPC ICONS 73 issues des ROI par imagerie et de la quantification de la cyanine dans les organes ont pu être corrélées (Figure 81 et Tableau XXV à partir des figures 79 et 80). La corrélation (de Pearson) est significative (P < 0,05) et le coefficient de corrélation $r = 0,6503$ (Tableau XXV).

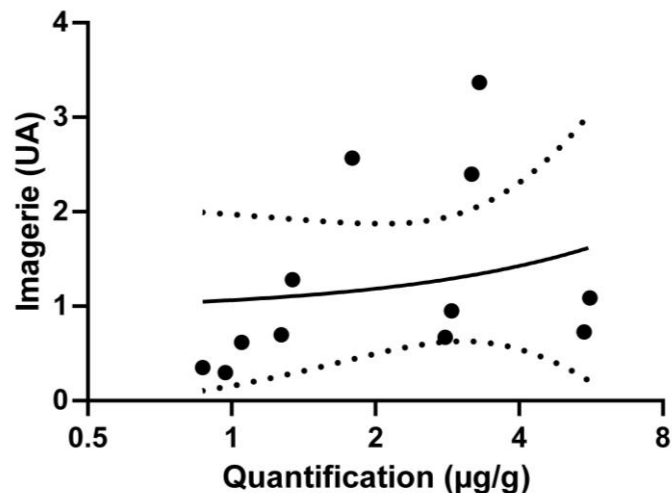


Figure 81 : Corrélation entre les données de fluorescence issues de l'imagerie (UA) et les données de la quantification dans les organes. Les organes inclus sont le foie et les reins 1 mois après injections des NPC (n=12).

Tableau XXV : Équation de la droite et corrélation des données d'imagerie et de quantification.

| | | r | P |
|-------------|-----------------------|--------|--------|
| Corrélation | | 0,6503 | 0,0257 |
| Équation | $Y = 0,1206 + 0,9444$ | | |

1.2.3) Discussion

L'absence de fluorescence chez les souris ayant reçu les NPC ICONS 30 permet de valider la spécificité de la fluorescence observée chez les souris traitées par les NPC ICONS 73-Cy5. De plus, la corrélation des données issues de l'imagerie et des données de quantification dans les organes souligne la cohérence des résultats. La présence importante de NPC dans le foie et la rate concorde avec nos données d'imagerie et celles de la littérature.

Cependant, une incohérence réside entre l'importante intensité de fluorescence retrouvée dans la vessie par imagerie et la faible intensité de fluorescence retrouvée dans les reins après quantification de la cyanine, ces deux valeurs devant être liées. La filtration glomérulaire (à travers l'endothélium fenestré des capillaires, la lame basale et les fentes de filtration) ne permet pas le passage de cellules, macromolécules ou grosses protéines (> 68 kDa). Étant donné la distribution gaussienne de la taille des NPC ICONS 73 mesurée par DLS (de 10 à 100 nm), les plus petites NPC pourraient passer par les reins puis la vessie. Si les NPC sont trop grosses pour passer, une hypothèse pourrait être que la cyanine se décroche partiellement des NPC et que seule la cyanine libre soit observée dans la vessie.

Contrairement au foie et à la rate, aucun consensus n'est admis sur la capacité des NPC à être excrétées par le système urinaire, et la littérature diverge sur ce sujet, la plupart des études ayant mis en évidence la présence de NPC dans les reins, mais la quantité est très variable d'une étude à l'autre :

- Certaines études ont suggéré une **présence très faible de NPC dans la vessie ou les reins.**

Une étude ayant utilisé des NPC de 3nm a rapporté une demi-vie d'environ 4h (Heckman et al., 2013). La quantification des taux de NPC réalisée par ICP entre 24h et 5 mois après l'injection (20mg/kg) montre que 24 heures après l'injection, le foie est l'organe qui contient le plus de NPC

(15µg/g), puis la rate (12µg/g), la quantité est faible dans les reins (1µg/g et augmente à 3µg/g à 2 mois) et elle négligeable dans le cerveau (0,3µg/g).

Des conclusions similaires ont été rapportées par une autre étude, après injection par différentes voies (IV, IP, PO) de NPC de 3-5 nm (Hirst et al., 2013). La quantification par ICP a démontré une quantité importante de NPC dans la rate (32µg/g), puis le foie (25µg/g) et une quantité négligeable dans les reins et les poumons (0,5µg/g ; Hirst et al., 2013). Aucune trace de NPC n'a été détectée dans le cerveau et le cœur.

Une étude utilisant des NPC de 10nm conjuguées au FITC a mis en évidence par microscopie à fluorescence la présence de NPC dans le foie et dans la rate après injection des NPC à 1 ou 20 mg/kg (Portioli et al., 2013). Des coupes d'histologie colorées par hématoxyline/éosine ont confirmé la présence de NPC dans le foie, la rate mais également dans les poumons et les reins après l'injection des NPC à 20mg/kg. Enfin, la quantification des NPC par ICP-MS 24h après les injections (20mg/kg) a démontré la présence de 6,7µg de NPC/g de foie (Portioli et al., 2013).

Une étude publiée en 2018 avec des NPC de 4 nm (et 30 nm en DLS) injectées à la dose de 0,5mg/kg par voie IV a mis en évidence la présence de NPC dans le foie (6 à 8µg/g) et la rate (1 à 2µg/g) et des taux très faibles (< 0,5µg/g) dans les reins, le cœur, les poumons et le cerveau (Bao et al., 2018). De plus, ces données corrélerent avec une excrétion principalement fécale, environ 10 fois plus importante que l'excrétion urinaire (Bao et al., 2018).

Une étude a également été publiée en 2018 réalisée avec des NPC d'environ 80 nm administrées aux doses de 30 et 300 mg/kg à des rats soit par voie orale soit par voie intraveineuse (Park et al., 2018). Par voie orale, toutes les NPC injectées se retrouvent dans les fèces. Après injection par voie IV, les NPC sont principalement retrouvées dans le foie et la rate, puis les poumons (10 fois moins) et les reins (100 fois moins). Aucune NPC n'est retrouvée dans les urines (Park et al., 2018).

Enfin, le groupe de Carlander et coll. a compilé des études de biodistribution en fonction de nombreux paramètres (voie d'administration, taille, recouvrement, dose) afin de réaliser un modèle de biodistribution (Carlander et al., 2018). Leurs données confirment la présence de NPC principalement au niveau du foie et de la rate, mais également dans les poumons, les reins et le cœur en quantité moindre. De plus, ils démontrent la présence de NPC en faible quantité dans le cerveau (Carlander et al., 2018).

- A l'inverse, des études ont montré une **présence importante de NPC dans la vessie et les reins.**

Une équipe utilisant des NPC de 5 nm radiomarquées a étudié la biodistribution par PET-Scan (Rojas et al., 2012). Elle a mis en évidence une quantité importante de NPC dans la vessie dans les premières heures suivant l'injection et aucune trace des NPC dans les reins, la rate, les poumons et le foie (Rojas et al., 2012).

Une autre équipe a étudié la biodistribution de NPC de 30 nm jusqu'à 90 jours (70mg/kg ; Yokel et al. 2012). Elle a montré qu'environ 0,01 et 0,5% de la dose injectée étaient retrouvés respectivement dans l'urine et les matières fécales au cours des 2 premières semaines. Cette étude est très complète car elle présente un classement des différents organes étudiés en fonction de la quantité de cérium retrouvée et ce 1, 7, 30 et 90 jours après les injections (Figure 82). Ces données confirment la présence importante de NPC dans la rate, le foie mais également dans les reins. De plus, cette étude montre une quantité non négligeable de NPC au niveau du cerveau et du liquide céphalo-rachidien, suggérant une capacité des NPC à passer la BHE.

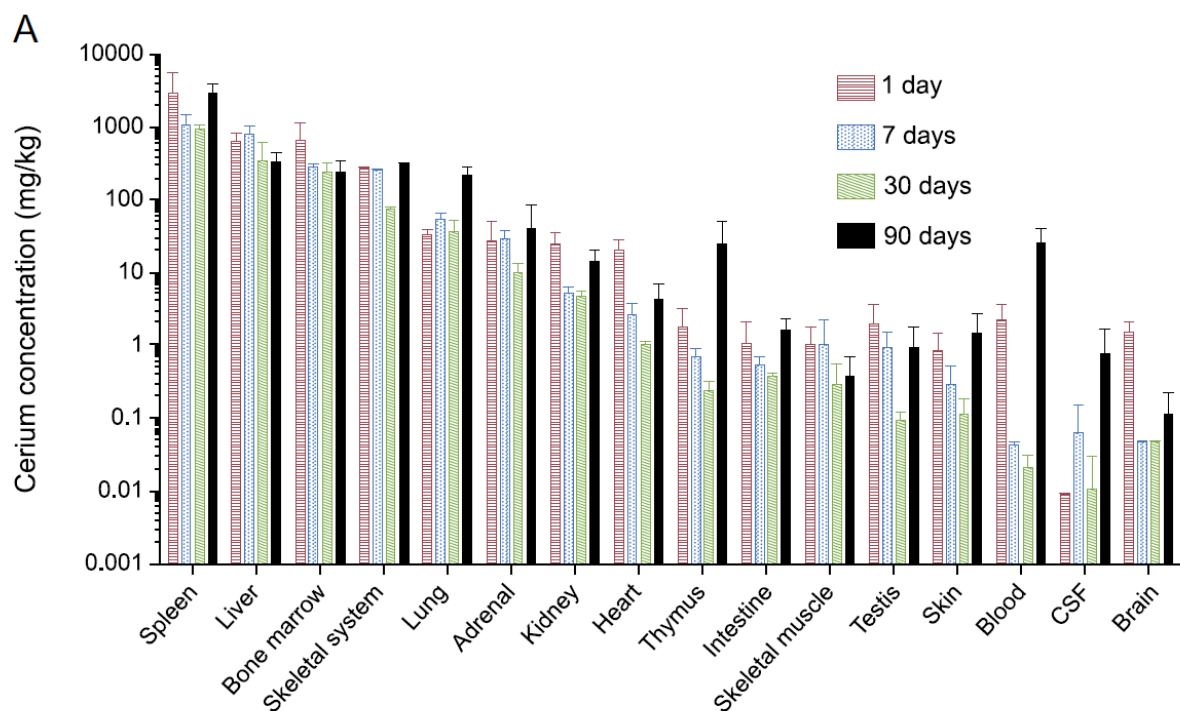


Figure 82 : Étude de la biodistribution de NPC de 30nm chez des rats par ICP. D'après Yokel et al., 2012.

De plus, le même groupe a ensuite étudié la biodistribution de NPC de 5, 15, 30 et 55 nm, et a quantifié le cérium dans le sang, le cerveau, la rate et le foie, mais n'a pas réalisé de mesure dans les reins (Yokel et al., 2013). Il a démontré la présence de toutes les NPC notamment au niveau du foie et de la rate ; les NPC de 5 nm présentent le temps de circulation le plus long et sont retrouvées en plus grande quantité dans le cerveau, confirmant la capacité des NPC à traverser la BHE

2) Toxicité des NPC

En parallèle des études de biodistribution, des études de toxicité ont été conduites sur les mêmes souris, 24h ou 1 mois après injection de sérum physiologique (souris contrôle), des NPC ICONS 30 et 73-Cy5 à 5mg / kg ; des souris naïves, sans aucune injection ont également été intégrées à cette étude. Une numération / formule sanguine (NFS) et un dosage des enzymes hépatiques ASAT et ALAT ont été effectués ainsi qu'une étude histologique des organes (Foie, Reins, Rate, Poumons, Cerveau) afin de détecter d'éventuelles atteintes (lésions, nécroses, fibroses, infiltrats hémorragiques ; Matériel et méthodes 3.2.1).

2.1) Effet des NPC sur la numération-formule sanguine

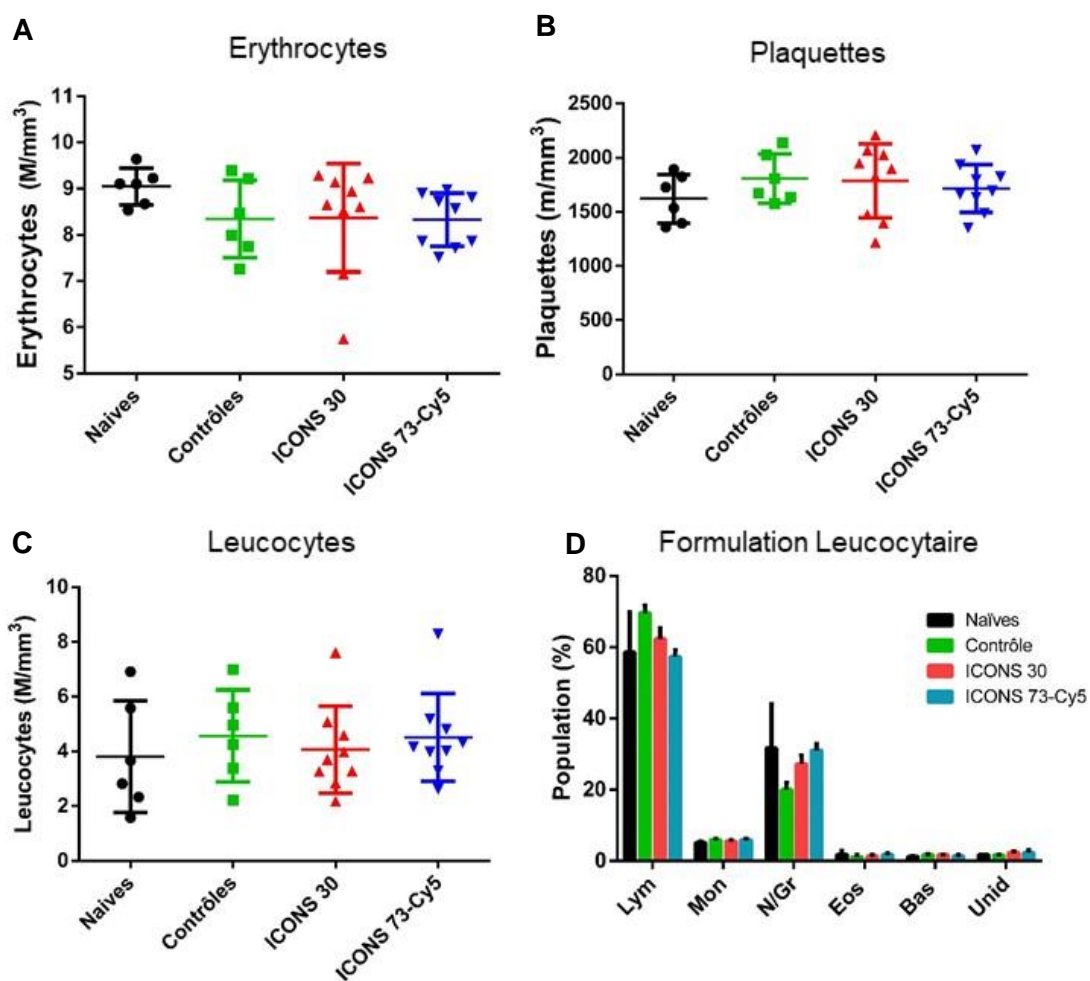
2.1.1) Protocole

Le sang est prélevé par voie intracardiaque (\approx 1mL) après anesthésie des animaux dans un tube eppendorf contenant 5 μ L d'EDTA à 0,5M. La NFS est réalisée par un automate (MS95, Melet Schloesing Laboratoires, Osny, France ; Matériel et méthodes 3.2.3).

2.1.2) Résultats

Les résultats issus de la NFS 24h après les injections sont présentés dans la figure 83 et le tableau XXVI, et ceux obtenus 1 mois après les injections dans la figure 84 et le tableau XXVII. Les NPC ICONS 30 et 73-Cy5 à 5mg/kg n'induisent aucune modification significative des numérations sanguines 24h (Figure 83 A – C et tableau XXVI) et 1 mois (Figure 84 A – C et tableau XXVII) après leur injection. Aucune modification des formules leucocytaires n'est observée à 24h (Figure 83 D et tableau XXVI) et

à 1 mois (Figure 84 D et tableau XXVII). De plus, les NPC n'induisent aucune modification significative des caractéristiques des érythrocytes, que ce soit à 24h (Tableau XXVI) ou à 1 mois (Tableau XXVII) après les injections.



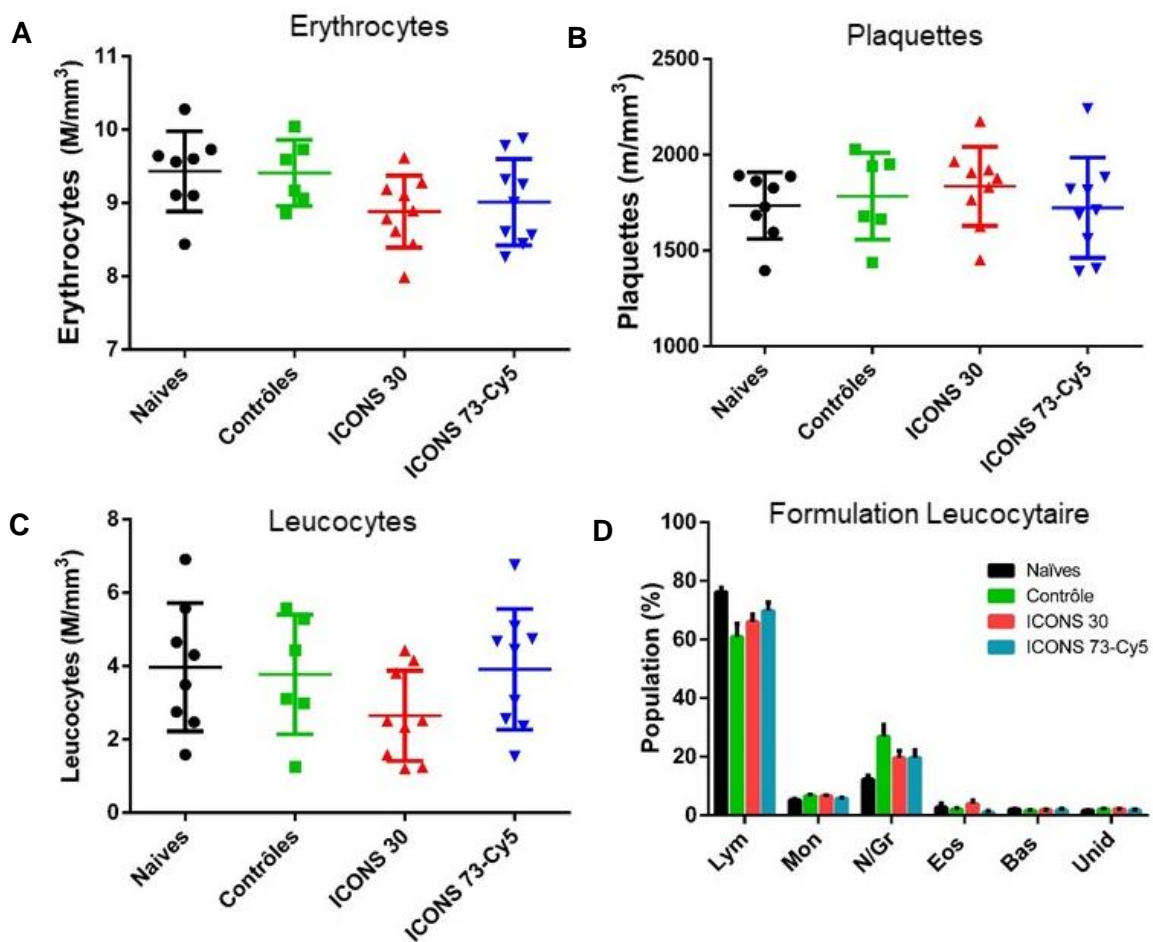
| | Leucocytes | | | | | | |
|------------------|-------------------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Leuc. (M/mm ³) | Lym. (%) | Mon. (%) | N/ Gr. (%) | Eos. (%) | Bas. (%) | ND. (%) |
| Naïves | 2,9 ± 0,4 | 58,6 ± 11,2 | 5,1 ± 0,5 | 31,7 ± 12,3 | 1,8 ± 1,1 | 1,2 ± 0,2 | 1,7 ± 0,1 |
| Contrôles | 4,6 ± 0,7 | 69,6 ± 2,1 | 5,9 ± 0,4 | 20,0 ± 2,0 | 1,1 ± 0,6 | 1,7 ± 0,2 | 1,6 ± 0,2 |

| | | | | | | | |
|---------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| ICONS 30 | 4,1 ± 0,5 | 62,3 ± 3,0 | 5,6 ± 0,3 | 27,2 ± 2,5 | 1,4 ± 0,1 | 1,7 ± 0,1 | 2,3 ± 0,4 |
| ICONS 73-Cy5 | 4,5 ± 0,5 | 57,3 ± 1,9 | 5,9 ± 0,4 | 31,0 ± 1,9 | 1,7 ± 0,5 | 1,4 ± 0,3 | 2,3 ± 0,7 |
| | Erythrocytes | | | | | | |
| | Eryth. (M/mm ³) | Hct. (%) | Hgb. (g/dL) | VGM (fL) | TCMH (pg) | CCMH (g/dL) | |
| Naïves | 8,8 ± 0,2 | 44,1 ± 0,9 | 10,8 ± 0,3 | 50,1 ± 1,2 | 12,2 ± 0,3 | 24,4 ± 0,1 | |
| Contrôles | 8,3 ± 0,3 | 42,9 ± 1,7 | 10,6 ± 0,5 | 49,8 ± 1,1 | 12,8 ± 0,5 | 25,6 ± 0,5 | |
| ICONS 30 | 8,4 ± 0,4 | 43,1 ± 2,2 | 11,6 ± 0,3 | 51,4 ± 0,5 | 14,1 ± 0,8 | 27,5 ± 1,5 | |
| ICONS 73-Cy5 | 8,3 ± 0,2 | 42,4 ± 1,0 | 11,1 ± 0,3 | 51,0 ± 0,8 | 13,4 ± 0,2 | 26,3 ± 0,7 | |

Figure 83 et Tableau XXVI : Effet des NPC sur la numération - formulation sanguine (NFS) à 24h.

Numération des érythrocytes (A), des plaquettes (B), des leucocytes (C), formule leucocytaire (D) et tableau des caractéristiques des leucocytes et érythrocytes (E) après l'injection de NaCl 0,9% (contrôles), des NPC ICONS 30, ICONS 73-Cy5 à 5mg/kg ou sans injection (naïves). Les résultats sont exprimés en moyenne ± ESM (n=9). ANOVA et test de Dunnett.

Abréviations, Leucocytes : Leucocytes (Leuc.), Lymphocyte (Lym.), Monocyte (Mon.), Neutrophile/Granulocyte (N/Gr.), Eosinophile (Eos.), Basophile (Bas.) Non déterminé (ND). Erythrocytes : Erythrocyte (Eryth.), Hématocrite (Hct.), Hémoglobine (Hgb.), Volume Globulaire Moyen (VGM), Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (TCMH), Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH). Unité : Million/ mm³ (M/mm³), millier/ mm³ (m/mm³), femtolitres (fL). Les résultats sont exprimés en moyenne ± ESM.



| | Leucocytes | | | | | | |
|---------------------|-------------------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Leuc. (M/mm ³) | Lym. (%) | Mon. (%) | N/ Gr. (%) | Eos. (%) | Bas. (%) | ND. (%) |
| Naïves | 4,0 ± 0,6 | 76,2 ± 1,6 | 5,2 ± 0,5 | 12,2 ± 1,3 | 2,7 ± 1,3 | 2,0 ± 0,2 | 1,7 ± 0,2 |
| Contrôle | 3,8 ± 0,7 | 60,9 ± 4,5 | 6,6 ± 0,5 | 26,9 ± 4,0 | 2,0 ± 0,5 | 1,6 ± 0,3 | 2,1 ± 0,3 |
| ICONS 30 | 2,6 ± 0,4 | 66,0 ± 2,5 | 6,5 ± 0,4 | 19,6 ± 2,5 | 3,9 ± 1,2 | 1,8 ± 0,2 | 2,1 ± 0,1 |
| ICONS 73-Cy5 | 3,9 ± 0,5 | 69,8 ± 2,9 | 5,7 ± 0,3 | 19,5 ± 1,9 | 1,0 ± 0,5 | 1,9 ± 0,3 | 1,8 ± 0,2 |

| | Erythrocytes | | | | | |
|---------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Eryth. (M/mm ³) | Hct. (%) | Hgb. (g/dL) | VGM (fL) | TCMH (pg) | CCMH (g/dL) |
| Naïves | 9,4 ± 0,2 | 45,5 ± 1,2 | 12,5 ± 0,3 | 48,3 ± 0,7 | 13,2 ± 0,2 | 27,5 ± 0,4 |
| Contrôle | 9,4 ± 0,2 | 45,6 ± 1,2 | 12,6 ± 0,4 | 48,4 ± 0,3 | 13,4 ± 0,2 | 27,7 ± 0,4 |
| ICONS 30 | 8,9 ± 0,2 | 42,7 ± 0,9 | 12,0 ± 0,3 | 48,1 ± 0,7 | 13,6 ± 0,2 | 28,2 ± 0,4 |
| ICONS 73-Cy5 | 9,0 ± 0,2 | 42,2 ± 0,9 | 12,2 ± 0,3 | 46,9 ± 0,6 | 13,5 ± 0,2 | 28,8 ± 0,3 |

Figure 84 et Tableau XXVII : Effet des NPC sur la numération - formulation sanguine (NFS) à 1 mois. Numération des érythrocytes (A), des plaquettes (B), des leucocytes (C), formule leucocytaire (D) et caractéristiques des leucocytes et érythrocytes (E) après l'injection de NaCl 0,9% (contrôles), des NPC ICONS 30, ICONS 73-Cy5 à 5mg/kg ou sans injection (naïves). Les résultats sont exprimés en moyenne ± ESM (n=9). ANOVA et test de Dunnett.

Abréviations, Leucocytes : Leucocytes (Leuc.), Lymphocyte (Lym.), Monocyte (Mon.), Neutrophile/Granulocyte (N/Gr.), Eosinophile (Eos.), Basophile (Bas.) Non déterminé (ND). Erythrocytes : Erythrocyte (Eryth.), Hématocrite (Hct.), Hémoglobine (Hgb.), Volume Globulaire Moyen (VGM), Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (TCMH), Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH). Unité : Million/ mm³ (M/mm³), millier/ mm³ (m/mm³), femtolitres (fL). Les résultats sont exprimés en moyenne ± ESM.

2.1.3) Discussion

L'ensemble de ces données montre une absence de toxicité de nos NPC à la dose 5mg/kg chez la souris et ce, jusqu'à 1 mois après les injections.

Ces résultats sont en accord avec deux autres études : la première a montré que les NPC seules (à 0,5mg/kg) ne modifiaient par la formule leucocytaire des souris (Selvaraj et al., 2015), la deuxième a également montré l'absence de modification des paramètres sanguins après injection de NPC à 5, 10 et 20 mg/kg (Bao et al., 2018).

A des doses plus importantes (30 à 300mg/kg), les NPC semble cependant induire une toxicité. Après injection de NPC par voie IV à la dose de 30mg/kg, une diminution des leucocytes et des lymphocytes (respectivement de 60% et 20%) ainsi qu'une augmentation des neutrophiles et des monocytes (respectivement d'un facteur 2,4 et 2,6) ont été rapportées (Park et al., 2018). A une dose de 300mg/kg, la diminution du taux de leucocytes était moins marquée (-40%) cependant, l'augmentation des

neutrophiles et la diminution des lymphocytes étaient plus importantes, respectivement d'un facteur 5 et de 40% (Park et al., 2018). Ces données ont été confirmées plus récemment en comparant 2 voies d'administration, orale et IV (Park et al., 2018). Seule une diminution du nombre de leucocytes a été observée lors de l'administration de NPC de 30 à 300mg/kg par voie orale. Concernant l'administration de NPC de 30 à 300mg/kg par voie IV, le nombre de plaquettes (à 300mg/kg) et de leucocytes (30 et 300mg/kg) dont les lymphocytes (30 et 300mg/kg) sont significativement diminués et le nombre de neutrophiles (30 et 300mg/kg) et de monocytes (30mg/kg) sont significativement augmentés (Park, 2018). Une autre étude a démontré une toxicité des NPC par augmentation des neutrophiles et des lymphocytes (Srinivas et al., 2011). Cependant, cette étude a exposé des rats à l'inhalation de NPC à des doses considérables de 641mg/m³.

Un effet protecteur des NPC a même été observé sur la NFS dans un modèle d'inflammation induite par le LPS (Selvaraj et al., 2015). Dans ce modèle qui diminue les taux de leucocytes et de lymphocytes et augmente le taux de granulocytes, les NPC ont en effet permis de rétablir ces altérations de la formulation leucocytaire.

2.2) Effet des NPC sur les transaminases hépatiques

2.3.1) Principe et Protocole

L'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT) sont des transaminases. Ces enzymes se retrouvent en quantité importante dans le foie et les muscles. Leur activité élevée reflète une atteinte hépatique mais également musculaire.

Le sang est prélevé par voie intracardiaque (≈ 1mL) après anesthésie des animaux dans un tube eppendorf contenant 5μL d'EDTA à 0,5M. Environ 500μL de sang est centrifugé à 12 000g pendant 10 minutes à 4°C, le sérum est prélevé, aliquoté et conservé à -40°C. Le sérum est décongelé le jour du dosage, l'ALAT et l'ASAT sont dosées au centre de biochimie automatisé de l'hôpital Necker (Hôpital Necker – Enfants malades, Paris; Matériel et méthodes 3.2.6).

2.3.2) Résultats

Vingt-quatre heures après les injections (Figure 85 A et C), l'activité ALAT des souris contrôles est de 18 ± 2 U/L et n'est pas modifiée par les injections de NPC ICONS 30 (24 ± 1 U/L) et de NPC ICONS 73-Cy5 (16 ± 1 U/L ; Figure 85 A). Concernant l'ASAT, le taux des souris contrôles est de 73 ± 18 U/L et n'est pas non plus modifié par les injections de NPC ICONS 30 (112 ± 24 U/L) et de NPC ICONS 73-Cy5 (81 ± 16 U/L ; Figure 85 C).

Un mois après les injections (Figure 85 C et D), l'activité ALAT des souris contrôles est de 20 ± 5 U/L et les injections de NPC ICONS 30 ou de NPC ICONS 73-Cy5 ne modifie pas ces valeurs : 41 ± 11 U/L et 37 ± 8 U/L respectivement (Figure 85 B). Pour l'ASAT, le taux des souris contrôles est de 63 ± 7 U/L. Il n'est modifié ni par les NPC ICONS 30 : 78 ± 7 U/L, ni par les NPC ICONS 73 – Cy5 : 90 ± 9 U/L (Figure 85 D).

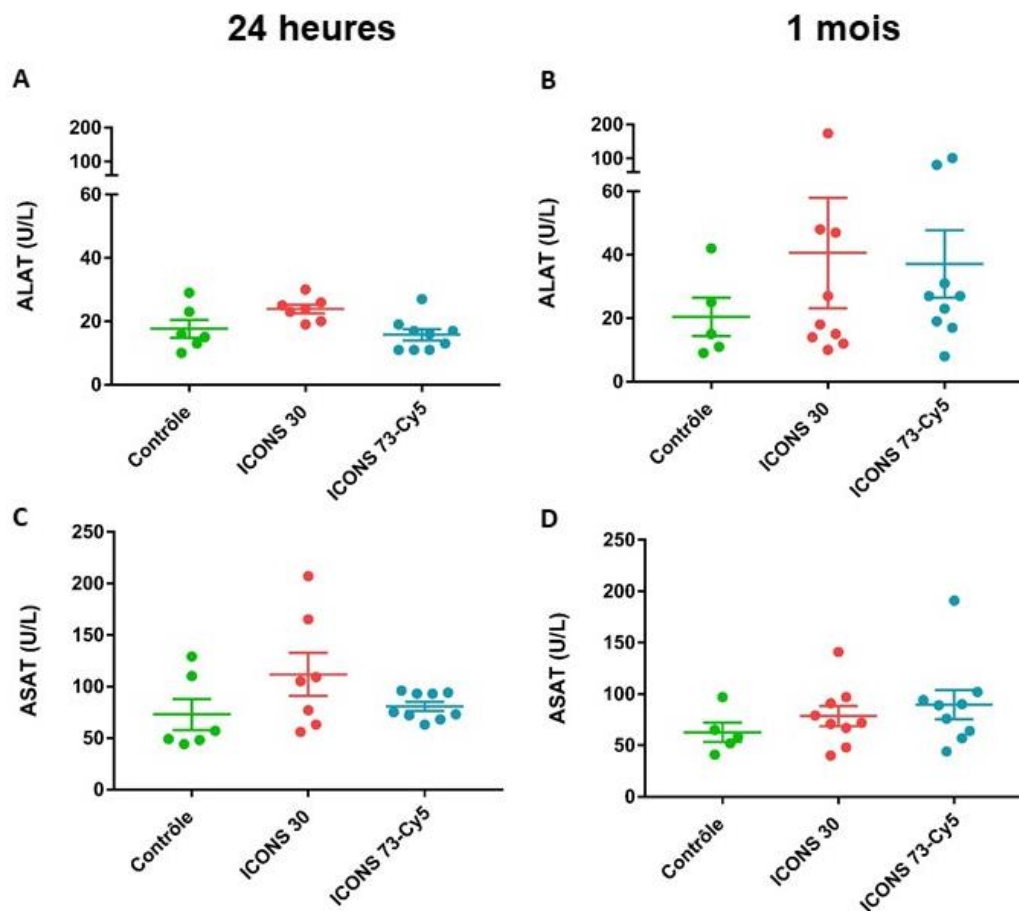


Figure 85 : Effet des NPC sur l'activité ALAT (A, B) et ASAT (C, D) à 24 heures (A, C) ou 1 mois (B, D). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ESM (n=9). ANOVA.

2.3.3) Discussion

Aucune modification de l'activité ALAT et ASAT n'est observée 24h et 1 mois après injection des NPC ICONS 30 et ICONS 73-Cy5 à 5mg/kg.

D'autres études ont mesuré les activités ASAT et ALAT après injection de NPC (Park et al., 2018 ; Bao et al., 2018). Une étude a confirmé l'absence de modification des taux d'ALAT et d'ASAT 1 mois après l'injection de NPC et 5 à 20mg/kg (Bao et al., 2018). Une autre étude à des doses plus importantes de 30 à 300 mg/kg a démontré une augmentation non significative des taux d'ASAT 24 heures après injection de NPC par IV : +30% à 30mg/kg et +140% à 300mg/kg (Park, 2018). Elle a également mis en évidence une augmentation non significative de l'activité ALAT : +60% à 30mg/kg et +150% à 300mg/kg 24h après l'injection des NPC (Park et al., 2018).

De plus, les données des activités enzymatiques rapportées par cette étude sont cohérentes avec les nôtres : environ 25U/L pour l'ALAT et environ 80U/L pour l'ASAT (Bao et al., 2018). Dans l'ensemble, ces données semblent confirmer l'absence de modification induite par l'injection de NPC de 5 à 300mg/kg par voie IV sur les activités ASAT et ALAT.

Ces résultats soulignent l'absence de toxicité hépatique des NPC et leur biocompatibilité.

2.3) Etude histologique de la toxicité des NPC

2.3.1) Protocole

Les études histologiques ont été réalisées sur le foie, les reins, la rate, les poumons et le cerveau. Les organes ont été prélevés 24 h ou 1 mois après l'injection de NPC puis fixés par du paraformaldéhyde à 4% pendant 24h à température ambiante. Les études histologiques ont ensuite été réalisées par Olivia Bawa (Module HistoCytoPathologie, Laboratoire de recherche translationnelle, Hôpital Gustave Roussy, Villejuif) sur des coupes de 4µm d'épaisseur colorées à l'hématoxyline/éosine / safran. Chaque lame est observée à l'aide d'un microscope Zeiss Axiophot et les photos sont prises à l'aide de la caméra et du logiciel d'acquisition Olyvia d'Olympus (Matériel et méthodes 3.2.4).

2.3.2) Résultats

Concernant la rate, aucune lésion n'est induite par les NPC ; la répartition, la densité et la taille des follicules ne sont pas modifiées par le traitement (Figure 86). La répartition homogène de la pulpe blanche (lymphocyte B) et de la pulpe rouge (lymphocyte T, macrophages) souligne la représentativité des lignées et l'immunocompétence des rates observées. Pour le foie, aucune lésion ou fibrose n'est induite par l'injection des NPC (Figure 86). Quelques foyers de régénération ont été observés, avec des noyaux plus volumineux ou doubles, mais ces foyers étaient localisés et aucune différence n'a été démontrée par rapport aux souris contrôles. Sur les reins, aucune lésion induite par les NPC n'a été observée (Figure 86). L'observation s'est notamment focalisée sur les glomérules et les capsules de Bowman mais aucune différence phénotypique n'a été observée entre les différents groupes. Concernant les poumons, aucune fibrose n'a été observée suite à l'injection de NPC (Figure 86). Quelques infiltrats hémorragiques ont été détectés, notamment dans les canaux alvéolaires. Cependant ces infiltrats ont également été détectés chez les souris contrôles et sembleraient donc être un artefact, les infiltrats seraient survenus post-mortem lors du prélèvement des échantillons, notamment après le prélèvement sanguin intracardiaque. Enfin, pour le cerveau, aucune lésion n'a été observée après les injections de NPC (Figure 86).

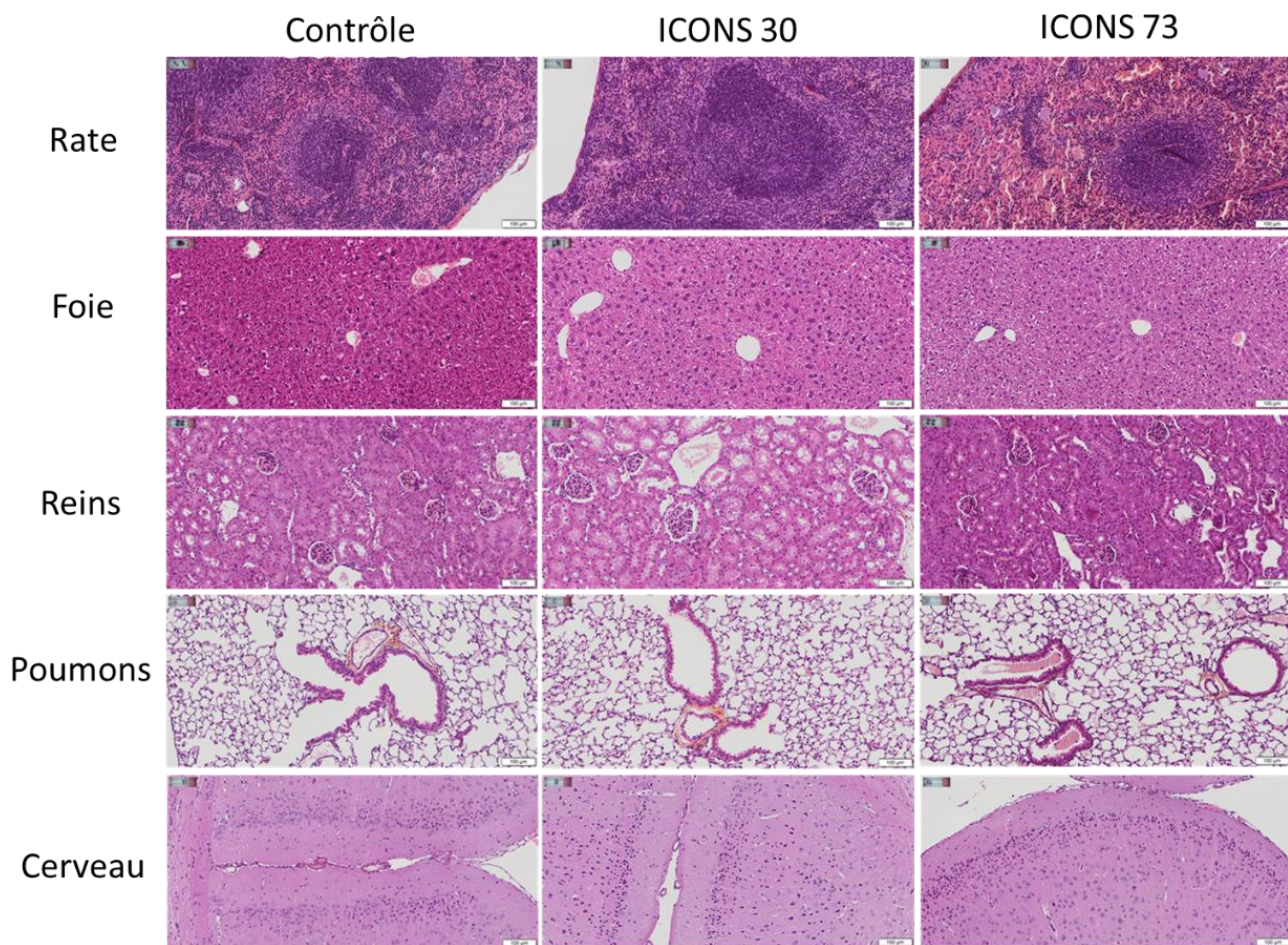


Figure 86 : Effet des NPC ICONS 30 et 73-Cy5 à 5mg/kg, 1 mois après leur injection sur différents organes analysés par histologie.

2.3.3) Discussion

Dans l'ensemble, ces données ne démontrent aucune toxicité des NPC sur les organes étudiés 24h (données non présentées) et 1 mois après une injection unique de NPC à 5mg/kg. Aucune lésion, nécrose, fibrose, régénération cellulaire, infiltrat hémorragique ou immunitaire significative n'ont été observés.

D'autres études histologiques ont également examiné la toxicité des NPC. Une étude histologique sur le cerveau, le pancréas, les reins, la rate, les poumons et le foie n'a démontré aucune différence entre les souris contrôles et les souris traitées 1 mois après injection des NPC à **0,5 mg/kg** (Hirst et al., 2013). L'étude réalisée par Portioli et coll. publiée en 2013 démontre les mêmes résultats avec la présence de NPC sur des coupes histologiques de foie, rate, poumon et reins sans lésions notables 24 heures après injection des NPC à des doses de **1 à 20 mg/kg** (Portioli et al., 2013). Une autre étude

publiée en 2018 n'a également démontré aucune lésion induite par les NPC à **5, 10 et 20 mg/kg** 24h à 1 mois après l'injection sur le cœur, le foie, la rate, les poumons et le rein (Bao et al., 2018). Enfin, une étude a réalisé des analyses histologiques sur le foie, la rate, l'hippocampe et le cervelet 90 jours après l'injection de NPC à des doses de **50 à 100mg/kg** et n'a mis en évidence aucune lésion (Yokel et al., 2013).

Nos données semblent cohérentes avec celles de la littérature et suggèrent une très bonne biocompatibilité des NPC *in vivo*.

Cependant, quelques études ont démontré une toxicité induite par les NPC. Une étude histologique a mis en évidence des lésions notamment sur les poumons avec une augmentation de la production de mucus, des NPC libres non phagocytées dans les bronches, bronchioles et alvéoles (Srinivas et al., 2011). Cependant, cette étude a exposé des rats à l'inhalation de NPC à des doses considérables de 641 mg/m³. A titre de comparaison, les taux maximaux de PM_{2,5} (Particules < 2,5 µm) à Dehli sont de 0,170 mg/m³ et de 0,020 mg/m³ à Paris (Krzyzanowski et al., 2014). L'équipe de Hardas et coll. a également publié deux études démontrant l'effet toxique et pro-oxydant des NPC. La première étude a rapporté des hémorragies pulmonaires et une toxicité hépatique mais la dose injectée était très importante (250 mg/kg par voie intraveineuse ; Hardas et al., 2010). La seconde présente des effets pro-oxydants des NPC (85 mg/kg par voie intraveineuse) avec notamment une diminution du glutathion et une augmentation de la NOSi, du glutathion oxydé, de Hsp-70 et de 3-NT (Hardas, 2012). Une autre étude a également montré par des études histologiques des lésions minimales dans les poumons et les reins et des lésions moyennes à modérées dans le foie après injection de NPC à la dose de 300 mg/kg (IV ; Park et al., 2018). Enfin, d'autres études ont également présenté des effets pro-oxydants et toxiques des NPC (Park et al., 2008, 2018; Xia et al., 2008), mais ces études semblent minoritaires.

Pour résumer, certaines études démontrent des effets pro-oxydants des NPC, mais par des voies d'administration particulière (inhalation) ou à des doses conséquentes (> 250 mg/kg).

3) Potentiel thérapeutique des NPC sur un modèle murin d'ischémie cérébrale

Après avoir démontré le potentiel antioxydant *in vitro* et l'absence de toxicité *in vivo* des NPC ICONS 73-Cy5, le potentiel thérapeutique des nanoparticules a été examiné dans un modèle murin d'ischémie cérébrale consistant à occlure l'artère cérébrale moyenne (ACM) par injection de thrombine.

3.1) Protocole

La thrombine (1 U/ μ L) est injectée au niveau de la bifurcation de l'ACM à l'aide d'une micropipette et le débit sanguin cérébral est monitoré par un laser Doppler (Matériel et Méthodes 3.3). Les NPC ICONS 73-Cy5 sont injectées 30 minutes après le début de l'ischémie aux doses de 0,5 ; 1 et 5 mg/kg. Les souris contrôles reçoivent selon le même protocole du NaCl 0,9%. Les animaux sont mis à mort 24 heures après l'ischémie et le sang (\approx 1mL) et le cerveau sont prélevés. Des coupes du cerveau de 1mm sont réalisées et colorées au TTC 2% pour la mesure du volume de lésion (Matériel et méthodes 3.3 et 3.4).

3.2) Résultats

Aucune mortalité n'a été observée, quel que soit le groupe d'animaux.

Les chutes de débit sanguin cortical 30 minutes après l'injection de thrombine ne sont pas significativement différentes entre les 4 groupes d'animaux (Débit sanguin cortical résiduel : contrôle : $23 \pm 3\%$; NPC ICONS 73-Cy5 (0,5 mg/kg): $20 \pm 4\%$; NPC ICONS 73-Cy5 (1 mg/kg) : $20 \pm 3\%$ NPC ICONS 73-Cy5 (5 mg/kg) : $19 \pm 4\%$).

Le volume de lésion des souris contrôles est de $25 \pm 4 \text{ mm}^3$ (Figure 87). Le volume de lésion des souris traitées par les NPC ICONS 73-Cy5 est respectivement de $32 \pm 4 \text{ mm}^3$, $29 \pm 4 \text{ mm}^3$, $28 \pm 4 \text{ mm}^3$ pour les doses de 0,5 - 1 et 5 mg/kg.

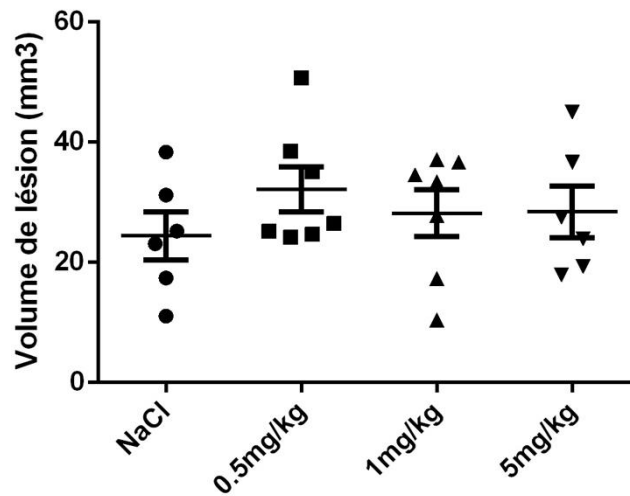


Figure 87 : Effet des NPC sur le volume de lésion des souris 24 heures après une ischémie cérébrale. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ESM (n=7). ANOVA.

3.3) Discussion

Dans nos conditions, les NPC n'ont pas permis de réduire le volume de lésion induit par l'ischémie cérébrale. Ces données sont contradictoires avec la littérature, la plupart des études ayant démontré un effet des NPC sur des modèles d'ischémie cérébrale. La première étude publiée en 2012 a rapporté une réduction de 50% du volume de lésion induit par les NPC à 0,5mg/kg sur un modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) pendant 60 minutes chez le rat (Kim et al., 2012). Trois études publiées en 2018 ont également démontré une diminution du volume de lésion par les NPC. Dans la première étude, sur un modèle de MCAO de 2h sur le rat, la dose de NPC de 0,5 mg/ kg a diminué de 45% le volume de lésion et jusqu'à 75% avec des NPC ciblant les intégrines (Zhang et al., 2018b). Une seconde étude a démontré une diminution du volume de lésion de 35% à 57% et une diminution du volume de l'œdème de 55 à 72% par des NPC à 10 mg/kg après une MCAO sur la souris (Gao et al., 2018). Enfin, la dernière étude a démontré un effet protecteur de leurs NPC entre 0,3 et 0,9 mg/kg sur un modèle de MCAO de 2h. Elle a mis en évidence une réduction du volume de lésion de 29% pour leurs NPC, 55% pour les mêmes NPC ciblant les récepteurs LRP et jusqu'à 76% pour les NPC chargées en edaravone (Bao et al., 2018).

CONCLUSIONS

&

PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de déterminer les capacités antioxydantes ainsi que la toxicité, l'internalisation et la biodistribution des NPC recouvertes par les polymères innovants synthétisés par notre partenaire Specific Polymers et d'évaluer leur potentiel thérapeutique dans un modèle murin d'ischémie cérébrale.

Dans un premier temps des études de **toxicité *in vitro*** ont démontré que le recouvrement par les PEG ICONS permet de prévenir la mortalité des cellules bEnd.3 induite par les NPC nues et de préserver, dans une certaine mesure, la perte de l'activité métabolique observée avec ces nanoparticules à forte concentration (1 000µg/mL). Dans un deuxième temps, des études de **toxicité *in vivo***, conduites sur des animaux naïfs n'ont démontré aucune toxicité aiguë ou chronique (jusqu'à 1 mois) induite par les NPC ICONS 73 – Cy5 à 5mg/kg : la numération et formulation sanguine (NFS) et les dosages des enzymes hépatiques n'ont montré aucune anomalie, tout comme les études histologiques des différents organes ; aucune mortalité n'a été observée. Ces résultats sont en accord avec les études *in vitro*, d'autant que la dose de 5mg/kg de NPC administrée aux souris correspond à une concentration plasmatique d'environ 75µg/mL et qu'aucune toxicité n'a été démontrée *in vitro* jusqu'à 100µg/mL de NPC ICONS 73. Ils sont aussi à mettre en parallèle avec l'élimination rapide des NPC chez la souris (cf ci-dessous). Dans la suite de ces résultats encourageants, des études à des temps plus tardifs (2 ou 3 mois) pourront être réalisées afin de confirmer la bonne tolérance de nos NPC à long terme.

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des NPC *in vitro*, nous avons mis au point un modèle de stress oxydant consistant à traiter les **cellules bEnd.3** par le glutamate afin de mimer l'excitotoxicité post-ischémique. Ce modèle a été caractérisé et validé par la présence d'une surproduction de radicaux libres, d'une consommation d'antioxydants endogènes et d'atteintes cellulaires, en l'occurrence, l'oxydation des acides nucléiques. Bien que ce modèle soit pertinent dans le contexte de l'excitotoxicité vectrice d'un stress oxydant post-ischémique, il serait intéressant de mettre également en œuvre d'autres modèles cellulaires encore plus proches de la physiopathologie, tels que des modèles de privation en glucose et en oxygène (OGD). Nonobstant, les NPC ont permis de limiter la production de radicaux libres et l'oxydation des acides nucléiques induites par le glutamate, ce qui montre qu'elles conservent leurs capacités antioxydantes même recouvertes par les PEG ICONS. Nous avons tenté d'évaluer l'effet des NPC sur d'autres types de dommages cellulaires induit par le stress oxydant dont notamment les dommages protéiques et lipidiques. Des tests préliminaires

ont été réalisés pour détecter la carbonylation des protéines et la présence de malondialdéhyde (marqueur de la peroxydation lipidique), mais nous n'avons pas réussi à démontrer une augmentation de ces dommages que ce soit après traitement des cellules par le glutamate (100mM) ou par l' H_2O_2 (2mM) ; nous avons donc dû abandonner ces études. Concernant l'oxydation des protéines, d'autres marqueurs sont à envisager tels que la détection des 3-nitrotyrosine. Pour la peroxydation lipidique, hormis la détection du malondialdéhyde, l'utilisation de sondes spécifiques de l'oxydation lipidiques telles que la sonde BODIPY C11, qui mesure l'oxydation de la partie butadiényle polyinsaturée de la sonde, ou du kit d'imagerie click-iT, qui détecte des résidus alkynes issus de la dégradation des lipides, pourraient être des alternatives.

L'absence d'effet des NPC sur les concentrations d'**antioxydant endogènes** (thiols totaux et glutathion) pourrait être lié à leur consommation trop rapide ; une étude réalisée sur des cellules HeLa a en effet montré une chute de 20% du glutathion 1 minute seulement après l'ajout d' H_2O_2 (500 μ M ; Jiang et al., 2017). Nos études montrent bien une internalisation des NPC dans 95% des cellules bEnd.3 à 4h, mais on peut envisager qu'à des temps très précoces, les cellules ne contiennent pas suffisamment de NPC pour s'opposer à la consommation des antioxydants endogènes induite par le glutamate. Dans ce contexte, seul un prétraitement par les NPC aurait pu permettre de charger les cellules en nanoparticules et prévenir la survenue de la surproduction des ERON et la chute des consommations de thiols totaux et de glutathion (c'est d'ailleurs ce type de stratégie qui est utilisée dans toutes les études avec les NPC), néanmoins, cela nous a semblé peu pertinent dans le cadre d'un futur traitement curatif pour les AVC ischémiques.

Les études d'**internalisation** ont démontré une internalisation rapide des NPC dans les cellules bEnd.3. L'utilisation de différentes techniques a permis d'obtenir des données complémentaires, l'ICP fournissant une quantification absolue et la possibilité de comparer les NPC nues et recouvertes par les PEG ICONS. Ainsi, l'ICP a permis de mettre en évidence une internalisation plus faible des NPC ICONS recouvertes par rapport aux NPC nues, mais qui ne semble pas compromettre l'activité antioxydante des NPC recouvertes. La fonctionnalisation des NPC par la cyanine a permis de mettre en œuvre un technique semi-quantitative, plus simple d'utilisation mais qui ne permet pas d'étudier les NPC non fonctionnalisées : la cytométrie en flux. La cytométrie a permis de mettre en évidence une internalisation rapide des NPC (95% des cellules contiennent des NPC dès 4h) et une augmentation de la quantité de NPC par cellule entre 4h et 24h. Dans le cadre de ces études et notamment de l'administration des NPC dans la circulation sanguine, des études non plus statiques, mais dans des systèmes microfluidiques seraient particulièrement intéressantes ; certaines études montrent en effet que l'internalisation de nanotransporteurs ciblant l'endothelium (plus particulièrement la molécule d'adhérence ICAM-1) est réduite par le flux (Bhowmick et al., 2012).

Concernant la **localisation** des NPC, les études de microscopie confocale à fluorescence ont permis de mettre en évidence la présence de NPC dans le cytoplasme des cellules bEnd.3 et aucune NPC n'a été observée dans leurs noyaux. Les études de microscopie électronique ont confirmé ces données en démontrant la présence de NPC dans des endosomes intracellulaires. Comme évoqué précédemment seules les NPC fonctionnalisées par la cyanine peuvent être observées en microscopie à fluorescence et il aurait été intéressant de comparer la localisation et l'état de dispersion des NPC nues et recouvertes par microscopie électronique. En effet, il est fort probable que les NPC nues, s'agréant à pH physiologique, soient internalisées par « paquets » augmentant ainsi la quantité de NPC internalisées mais diminuant par conséquent leur état de surface. Aucune NPC n'a été observée dans le noyau et les mitochondries, cette dernière information est à rapprocher de l'incapacité des NPC à réduire la production mitochondriale d'anions superoxydes induite par l' H_2O_2 (sauf les NPC ICONS 73 pour lesquelles nous n'avons pas pu réaliser d'étude de microscopie électronique). En perspective, des marqueurs d'organites intracellulaires pourraient être utilisés en microscopie à fluorescence dont des marqueurs d'endosomes, de lysosomes, de peroxysomes, de mitochondrie ou de l'appareil de golgi afin de préciser la localisation subcellulaire. Des études sur le mécanisme d'internalisation des NPC pourraient également conduire à des données intéressantes. Ainsi, l'effet d'un co-traitement des cellules bEnd.3 par les NPC et différents inhibiteurs dont l'azide de sodium (qui bloque l'internalisation énergie- dépendante), l'oxyde de phénylarsine (qui bloque l'endocytose), le sucrose et la chlorpromazine (qui inhibe l'internalisation clathrine-dépendante), le nocodazole (qui bloque la macropinocytose), la cytochalasine D (qui perturbe les microtubules), la filipin (qui inhibe l'endocytose associée aux cavéoles), la brefeldin A (qui perturbe l'appareil de golgi) et enfin la monensine (un inhibiteur de lysosome) pourrait être testé.

Les études de **biodistribution** réalisées sur la souris ont mis en évidence un temps de demi-vie de 40 minutes environ, avec une localisation des NPC principalement dans la face ventrale des souris. Ces données corrélerent avec le dosage de la cyanine dans les organes qui démontre une importante quantité de NPC dans le foie, la rate et une quantité plus faible dans les reins et les poumons. La quantité plus faible de NPC à 1 mois souligne une faible accumulation à long terme des NPC dans les organes des animaux bien que des temps plus tardifs tels que 2 et 3 mois auraient pu être effectués. Concernant les ROIS effectués sur l'animal, d'autres régions d'intérêts auraient pu être étudiées telles que les poumons, la rate et le cerveau afin d'améliorer la corrélation entre les données de fluorescence par imagerie et par quantification dans les organes, bien que cette corrélation soit déjà significative avec 12 points mesurés. La principale problématique de l'observation indirecte des NPC par l'intermédiaire de la cyanine est l'incertitude sur la stabilité de la liaison cyanine – NPC chez

l'animal. C'est pourquoi le dosage des NPC dans les organes par ICP-OES doit être réalisé sous peu. Ces données permettront de comparer et corrélérer les données issues de la quantification indirecte par la cyanine et du cérium dans les organes. Une telle corrélation entre ces deux techniques validerait la fixation durable de la cyanine aux NPC. De plus, les dosages de la cyanine et du cérium dans le sérum et les urines des animaux traités par les NPC seront également réalisés ultérieurement pour compléter ces études.

Concernant l'étude des **NPC ciblantes**, l'étude par microscopie à fluorescence a permis de mettre en évidence un signal plus important pour les NPC ciblantes par rapport aux non ciblantes. Cependant aucune étude sur la spécificité ou la colocalisation des NPC ciblantes et de VCAM-1 n'a été fructueuse. En effet de nombreuses études préliminaires ont été réalisées par cytométrie et ELISA. Concernant les études par cytométrie aucune différence n'a été mise en évidence entre les NPC ciblantes et les non ciblantes, la principale problématique résidant dans l'importante internalisation des NPC non-ciblantes. Des expériences ont été menées sur des temps d'incubations plus courts (30 et 60 minutes) et/ ou à 4°C afin de bloquer l'internalisation active mais étonnement l'internalisation était toujours aussi importante pour les NPC non-ciblantes. Ainsi, il serait intéressant d'utiliser les inhibiteurs d'endocytoses préalablement cités pour bloquer l'internalisation des NPC non-ciblantes et démontrer une internalisation ou une fixation plus importante des NPC ciblantes, médiées par VCAM-1. Pour les études par ELISA, malgré de nombreuses conditions et anticorps testés, aucune courbe de calibration de VCAM-1 n'a été obtenue. En perspective, la mise au point d'autres techniques pourrait être effectuée dont l'immunoprécipitation ou l'optimisation des techniques déjà testées, dont la microscopie à fluorescence ou la cytométrie en flux. Pour la microscopie à fluorescence, le co-marquage de VCAM-1 et des NPC pourrait être évalué.

Concernant l'effet des NPC dans un **modèle murin d'ischémie**, au commencement de notre projet, seule une étude avait été publiée sur l'effet protecteur des NPC dans un modèle d'ischémie (NPC Pégylées et MCAO de 1h) et avait démontré une réduction de 50% du volume de lésion aux doses de 0,5 et 0,7mg/kg. Durant ce travail de thèse, 3 études utilisant des NPC dans un modèle d'ischémie cérébrale ont été publiées soulignant ainsi l'intérêt du projet (Bao et al., 2018; Gao et al., 2018; Zhang et al., 2018b). La première étude a mis en évidence une diminution du volume de lésion de 40% par leur NPC et d'environ 70% avec leur NPC ciblant les intégrines $\alpha\beta3$ (NPC biotylées à 0,5mg/kg et MCAO de 2h ; Zhang et al., 2018). La deuxième étude a démontré une diminution du volume de lésion de 35% par leur NPC et de 57% par leur NPC recouverte par des PEG-PGLA à une dose de 10 mg/kg (Gao et al., 2018). Enfin, la dernière étude a utilisé des NPC Pégylées (0,5mg/kg) ciblant les récepteurs LRP de la BHE et chargées en édaravone dans un modèle d'ischémie cérébrale (MCAO 2h ; Bao et al., 2018) et a mis en évidence une réduction du volume de lésion de 29% par les

NPC-pégylées, de 55% par les NPC pégylées et ciblantes et de 76% par les NPC pégylées, ciblantes et chargées en edaravone. Bien que dans nos conditions, les NPC n'ont pas permis de réduire le volume de lésion, de nombreuses pistes peuvent être envisagées :

- L'augmentation de la **dose de NPC** : Bien que la plupart des études aient utilisé des doses de 0,5mg/kg, une étude a testé une dose de 10mg/kg. Sachant que seules des études utilisant des doses supérieures à 30mg/kg ont montré une toxicité des NPC, une augmentation des doses à 10 ou 20mg/kg serait une perspective envisageable dans notre modèle d'ischémie cérébrale.

- La **voie d'administration** : Dans les modèles d'ischémies toutes les NPC ont été injectées par voie intraveineuse, cependant des études de biodistribution ont démontré que les administrations par voies intracarotidienne et intra-jugulaire conduisaient à une plus grande quantité de NPC dans le parenchyme cérébral. Ainsi, l'administration des NPC par ces voies serait une perspective intéressante.

- Le **modèle d'ischémie** : De nombreux modèles d'ischémies existent : transitoire ou permanent, thrombo-embolique par injection de thrombine dans l'ACM ou mécanique (par ligature). De plus, le temps de l'occlusion diffère également pour un même modèle (de 30 min à 2h). Enfin, les délais de mise à mort peuvent également varier. La plupart des études mettent à mort leurs animaux 24h après l'ischémie, cependant dans certaines études, les animaux sont mis à mort 6h après le début de l'ischémie (Kim et al., 2012). Ainsi des mises à mort plus précoces (6h) ou plus tardives (48h, 72h) pourraient être une perspective envisageable.

- **Les délais de traitements** : Dans notre cas, nous pourrions tester des traitements plus précoces en cours d'ischémie, au moment de l'injection de thrombine plutôt que 30 minutes après comme cela a été le cas.

- **Le ciblage** : Toutes les études qui ont utilisé des NPC ciblantes ont démontré un effet protecteur plus important de ces NPC ; nos NPC ciblantes pourraient donc également induire une diminution significative du volume de lésion.

- **Co-administration avec le rt-PA** : nos NPC ciblantes pourraient pu être testées en co-traitement avec le rt-PA. En effet, les NPC auraient pu limiter les effets délétères du rt-PA dont l'augmentation du risque de TH.

Dans le cadre du traitement par le rt-PA, certaines études ont utilisées une stratégie différente par l'utilisation de NP directement chargées en rt-PA (Deng et al., 2018; Huang et al., 2019; Mei et al., 2019; Xu et al., 2019). Plusieurs stratégies sont développées dont l'encapsulation de rt-PA dans des PEG permettant de réduire de 90% la dose de rt-PA (Deng et al., 2018) ; l'encapsulation de rt-PA et

d'un antioxydant ou d'un agent neuroprotecteur permettant de limiter le volume de lésion (Mei et al., 2019; Xu et al., 2019) et l'encapsulation de rt-PA dans des NP magnétiques et le ciblage du thrombus par un aimant (Huang et al., 2019).

Il est à noter qu'un certain nombre d'études était envisagé en complément de l'évaluation de l'effet neuroprotecteur de nos NPC dans notre modèle *in vivo* d'ischémie cérébrale, cependant les délais dans l'expertise par le comité d'éthique de notre projet (il a fallu plus d'un an avant d'obtenir un avis), ne nous ont pas permis d'aller au bout de nos expériences. En particulier, des investigations sont encore en cours sur les coupes de cerveaux et dans le sérum des animaux des animaux ischémiés après traitement par les NPC pour évaluer l'effet antioxydant *in vivo* des NPC ICONS 73 (sur la production de radicaux libres avec la sonde H₂DCF-DA, le MitoSoxRed), la consommation des antioxydants endogènes (SOD, CAT, Thiols Totaux, Glutathion), l'atteinte cellulaire (carbonylation des protéines, peroxydation lipidique et oxydation des acides nucléiques). D'autres expériences de microscopie confocale sur ces mêmes coupes devraient permettre d'évaluer l'internalisation des NPC ; là encore, la présence du flux sanguin a pu perturber cette dernière et réduire l'efficacité de nos particules.

En conclusion, cette étude démontre que le recouvrement des NPC diminue leur toxicité cellulaire sans affecter leur capacité antioxydante. L'absence de toxicité et d'accumulation à long terme chez l'animal est également un point encourageant. Bien que nous n'ayons pas mis en évidence d'effet bénéfique de nos NPC dans nos conditions dans un modèle expérimental d'ischémie cérébrale, des études complémentaires doivent être effectuées afin de confirmer le potentiel thérapeutique de l'administration des NPC dans le cadre des AVC mais aussi d'autres pathologies liées au stress oxydant.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

- A. Muralikrishna Rao, James F. Hatecher, and Robert J. Dempsey (1999). Lipid metabolism in ischemic neuronal death. *Recent Research Developments in Neurochemistry* 533–549.
- Aarts, M.M., and Tymianski, M. (2005). TRPM7 and ischemic CNS injury. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 11, 116–123.
- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F.J., and Curran, T. (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249, 1157–1161.
- Abdullahi, W., Tripathi, D., and Ronaldson, P.T. (2018). Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 315, C343–C356.
- Abonia, J.P., Hallgren, J., Jones, T., Shi, T., Xu, Y., Koni, P., Flavell, R.A., Boyce, J.A., Austen, K.F., and Gurish, M.F. (2006). Alpha-4 integrins and VCAM-1, but not MAdCAM-1, are essential for recruitment of mast cell progenitors to the inflamed lung. *Blood* 108, 1588–1594.
- Abramov, A.Y., Scorziello, A., and Duchen, M.R. (2007). Three Distinct Mechanisms Generate Oxygen Free Radicals in Neurons and Contribute to Cell Death during Anoxia and Reoxygenation. *J. Neurosci.* 27, 1129–1138.
- Adams, H.P., Bendixen, B.H., Kappelle, L.J., Biller, J., Love, B.B., Gordon, D.L., and 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* 24, 35–41.
- Adams, H.P., Brott, T.G., Furlan, A.J., Gomez, C.R., Grotta, J., Helgason, C.M., Kwiatkowski, T., Lyden, P.D., Marler, J.R., Torner, J., et al. (1996). Guidelines for thrombolytic therapy for acute stroke: a supplement to the guidelines for the management of patients with acute ischemic stroke. A statement for healthcare professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association. *Circulation* 94, 1167–1174.
- Adams, H.P., Woolson, R.F., Clarke, W.R., Davis, P.H., Bendixen, B.H., Love, B.B., Wasek, P.A., and Grimsman, K.J. (1997). Design of the trial of Org 10172 in acute stroke treatment (TOAST). *Control. Clin. Trials* 18, 358–377.
- Adams, L., Franco, M.C., and Estevez, A.G. (2015). Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 240, 711–717.
- Adibhatla, R.M., and Hatcher, J.F. (2008). Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 7, 243–253.
- Akdemir, H., Aşık, Z., Paşaoğlu, H., Karaküçük, I., Oktem, I.S., and Koç, R.K. (2001). The effect of allopurinol on focal cerebral ischaemia: an experimental study in rabbits. *Neurosurg. Rev.* 24, 131–135.

- Al-Ajlan, F.S., Goyal, M., Demchuk, A.M., Minhas, P., Sabiq, F., Assis, Z., Willinsky, R., Montanera, W.J., Rempel, J.L., Shuaib, A., et al. (2016). Intra-Arterial Therapy and Post-Treatment Infarct Volumes: Insights From the ESCAPE Randomized Controlled Trial. *Stroke* 47, 777–781.
- Albers, G.W., von Kummer, R., Truelsen, T., Jensen, J.-K.S., Ravn, G.M., Grønning, B.A., Chabriat, H., Chang, K.-C., Davalos, A.E., Ford, G.A., et al. (2015). Safety and efficacy of desmoteplase given 3-9 h after ischaemic stroke in patients with occlusion or high-grade stenosis in major cerebral arteries (DIAS-3): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 14, 575–584.
- Albers, G.W., Marks, M.P., Kemp, S., Christensen, S., Tsai, J.P., Ortega-Gutierrez, S., McTaggart, R.A., Torbey, M.T., Kim-Tenser, M., Leslie-Mazwi, T., et al. (2018). Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging. *N. Engl. J. Med.* 378, 708–718.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *The Mitochondrion*. Mol. Biol. Cell 4th Ed.
- Alexandrov, A.V., Demchuk, A.M., Felberg, R.A., Christou, I., Barber, P.A., Burgin, W.S., Malkoff, M., Wojner, A.W., and Grotta, J.C. (2000). High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tPA infusion when continuously monitored with 2-MHz transcranial doppler monitoring. *Stroke* 31, 610–614.
- Alexandrova, M., Bochev, P., Markova, V., Bechev, B., Popova, M., Danovska, M., and Simeonova, V. (2004). Dynamics of free radical processes in acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 11, 501–506.
- Ali, S.S., Hardt, J.I., Quick, K.L., Kim-Han, J.S., Erlanger, B.F., Huang, T.-T., Epstein, C.J., and Dugan, L.L. (2004). A biologically effective fullerene (C60) derivative with superoxide dismutase mimetic properties. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1191–1202.
- Ali, S.S., Hardt, J.I., and Dugan, L.L. (2008). SOD activity of carboxyfullerenes predicts their neuroprotective efficacy: a structure-activity study. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 4, 283–294.
- Alili, L., Sack, M., Karakoti, A.S., Teuber, S., Puschmann, K., Hirst, S.M., Reilly, C.M., Zanger, K., Stahl, W., Das, S., et al. (2011). Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions. *Biomaterials* 32, 2918–2929.
- Alili, L., Sack, M., von Montfort, C., Giri, S., Das, S., Carroll, K.S., Zanger, K., Seal, S., and Brenneisen, P. (2013). Downregulation of tumor growth and invasion by redox-active nanoparticles. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 765–778.
- Allen, T.M., and Chonn, A. (1987). Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.* 223, 42–46.
- Amantea, D., and Bagetta, G. (2017). Excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters in stroke: from neurotoxicity to ischemic tolerance. *Curr. Opin. Pharmacol.* 35, 111–119.
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L.R., Donnan, G.A., and Hennerici, M.G. (2009a). Classification of stroke subtypes. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 27, 493–501.
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L.R., Donnan, G.A., and Hennerici, M.G. (2009b). New approach to stroke subtyping: the A-S-C-O (phenotypic) classification of stroke. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 27, 502–508.

Amarenco, P., Lavallée, P.C., Labreuche, J., Ducrocq, G., Juliard, J.-M., Feldman, L., Cabrejo, L., Meseguer, E., Guidoux, C., Adraï, V., et al. (2011). Prevalence of coronary atherosclerosis in patients with cerebral infarction. *Stroke* 42, 22–29.

Amarenco, P., Labreuche, J., and Lavallée, P.C. (2012). Patients with transient ischemic attack with ABCD2 <4 can have similar 90-day stroke risk as patients with transient ischemic attack with ABCD2 ≥4. *Stroke* 43, 863–865.

Amarenco, P., Lavallée, P.C., Labreuche, J., Albers, G.W., Bornstein, N.M., Canhão, P., Caplan, L.R., Donnan, G.A., Ferro, J.M., Hennerici, M.G., et al. (2016). One-Year Risk of Stroke after Transient Ischemic Attack or Minor Stroke. *N. Engl. J. Med.* 374, 1533–1542.

Amin, K.A., Hassan, M.S., Awad, E.-S.T., and Hashem, K.S. (2011). The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline. *Int. J. Nanomedicine* 6, 143–149.

Amiri-Nikpour, M.R., Nazarbaghi, S., Hamdi-Holasou, M., and Rezaei, Y. (2015). An open-label evaluator-blinded clinical study of minocycline neuroprotection in ischemic stroke: gender-dependent effect. *Acta Neurol. Scand.* 131, 45–50.

Anderson, C.S., Robinson, T., Lindley, R.I., Arima, H., Lavados, P.M., Lee, T.-H., Broderick, J.P., Chen, X., Chen, G., Sharma, V.K., et al. (2016). Low-Dose versus Standard-Dose Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* 374, 2313–2323.

Anderson, M.F., Nilsson, M., Eriksson, P.S., and Sims, N.R. (2004). Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neurosci. Lett.* 354, 163–165.

Andrabi, S.A., Spina, M.G., Lorenz, P., Ebmeyer, U., Wolf, G., and Horn, T.F.W. (2004). Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 1017, 98–107.

Andreou, A., and Feussner, I. (2009). Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* 70, 1504–1510.

Annibal, A., Colombo, G., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Fedorova, M., and Hoffmann, R. (2016). Identification of dityrosine cross-linked sites in oxidized human serum albumin. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 1019, 147–155.

Aranda, A., Sequedo, L., Tolosa, L., Quintas, G., Burello, E., Castell, J.V., and Gombau, L. (2013). Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 27, 954–963.

Armentero, M.-T., Levandis, G., Bazzini, E., Cerri, S., Ghezzi, C., and Blandini, F. (2011). Adhesion molecules as potential targets for neuroprotection in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 43, 663–668.

Arsava, E.M., Kim, G.-M., Oliveira-Filho, J., Gungor, L., Noh, H.J., Lordelo, M. de J., Avery, R., Maier, I.L., and Ay, H. (2016). Prediction of Early Recurrence After Acute Ischemic Stroke. *JAMA Neurol.* 73, 396–401.

Arya, A., Sethy, N.K., Das, M., Singh, S.K., Das, A., Ujjain, S.K., Sharma, R.K., Sharma, M., and Bhargava, K. (2014). Cerium oxide nanoparticles prevent apoptosis in primary cortical culture by stabilizing mitochondrial membrane potential. *Free Radic. Res.* 48, 784–793.

- Arya, A., Gangwar, A., Singh, S.K., Roy, M., Das, M., Sethy, N.K., and Bhargava, K. (2016). Cerium oxide nanoparticles promote neurogenesis and abrogate hypoxia-induced memory impairment through AMPK-PKC-CBP signaling cascade. *Int. J. Nanomedicine* *11*, 1159–1173.
- Asahi, M., Wang, X., Mori, T., Sumii, T., Jung, J.C., Moskowitz, M.A., Fini, M.E., and Lo, E.H. (2001). Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 7724–7732.
- Asati, A., Santra, S., Kaittanis, C., Nath, S., and Perez, J.M. (2009). Oxidase-like activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *48*, 2308–2312.
- Asati, A., Santra, S., Kaittanis, C., and Perez, J.M. (2010). Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano* *4*, 5321–5331.
- Astrup, J., Symon, L., Branston, N.M., and Lassen, N.A. (1977). Thresholds of cerebral ischemia. In *Microsurgery for Stroke*, P. Schmiedek, O. Gratzl, and R.F. Spetzler, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 16–21.
- Atochin, D.N., Wang, A., Liu, V.W.T., Critchlow, J.D., Dantas, A.P.V., Looft-Wilson, R., Murata, T., Salomone, S., Shin, H.K., Ayata, C., et al. (2007). The phosphorylation state of eNOS modulates vascular reactivity and outcome of cerebral ischemia in vivo. *J. Clin. Invest.* *117*, 1961–1967.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., and Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2014*.
- Ayis, S.A., Coker, B., Rudd, A.G., Dennis, M.S., and Wolfe, C.D.A. (2013). Predicting independent survival after stroke: a European study for the development and validation of standardised stroke scales and prediction models of outcome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *84*, 288–296.
- Azarias, G., and Chatton, J.-Y. (2011). Selective ion changes during spontaneous mitochondrial transients in intact astrocytes. *PLoS One* *6*, e28505.
- Azarias, G., Perreten, H., Lengacher, S., Poburko, D., Demaurex, N., Magistretti, P.J., and Chatton, J.-Y. (2011). Glutamate transport decreases mitochondrial pH and modulates oxidative metabolism in astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 3550–3559.
- Badhiwala, J.H., Nassiri, F., Alhazzani, W., Selim, M.H., Farrokhyar, F., Spears, J., Kulkarni, A.V., Singh, S., Alqahtani, A., Rochweg, B., et al. (2015). Endovascular Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke: A Meta-analysis. *JAMA* *314*, 1832–1843.
- Badran, M.M., Taha, E.I., Tayel, M.M., and Al-Suwayeh, S.A. (2014). Ultra-fine self nanoemulsifying drug delivery system for transdermal delivery of meloxicam: Dependency on the type of surfactants. *J. Mol. Liq.* *190*, 16–22.
- Baker, K., Marcus, C.B., Huffman, K., Kruk, H., Malfroy, B., and Doctrow, S.R. (1998). Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *284*, 215–221.
- Bakhai, A. (2004). The burden of coronary, cerebrovascular and peripheral arterial disease. *Pharmacoeconomics* *22 Suppl 4*, 11–18.

- Baldirim, V., Bedioui, F., Mignet, N., Margail, I., and Berret, J.-F. (2018). The enzyme-like catalytic activity of cerium oxide nanoparticles and its dependency on Ce³⁺ surface area concentration. *Nanoscale* *10*, 6971–6980.
- Bandera, E., Botteri, M., Minelli, C., Sutton, A., Abrams, K.R., and Latronico, N. (2006). Cerebral blood flow threshold of ischemic penumbra and infarct core in acute ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* *37*, 1334–1339.
- Bangham, A.D., Standish, M.M., and Watkins, J.C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* *13*, 238–IN27.
- Bano, D., and Nicotera, P. (2007). Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke* *38*, 674–676.
- Bao, Q., Hu, P., Xu, Y., Cheng, T., Wei, C., Pan, L., and Shi, J. (2018). Simultaneous Blood-Brain Barrier Crossing and Protection for Stroke Treatment Based on Edaravone-Loaded Ceria Nanoparticles. *ACS Nano* *12*, 6794–6805.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res.* *339*, 269–280.
- Barenholz, Y. (2012). Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *160*, 117–134.
- Baron, J.C. (1999). Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* *9*, 193–201.
- Barone, F.C., and Feuerstein, G.Z. (1999). Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *19*, 819–834.
- Baskaya, M.K., Hu, Y., Donaldson, D., Maley, M., Rao, A.M., Prasad, M.R., and Dempsey, R.J. (1996). Protective effect of the 5-lipoxygenase inhibitor AA-861 on cerebral edema after transient ischemia. *J. Neurosurg.* *85*, 112–116.
- Bath, P.M., Krishnan, K., and Appleton, J.P. (2017). Nitric oxide donors (nitrates), L-arginine, or nitric oxide synthase inhibitors for acute stroke. *Cochrane Database Syst. Rev.* *4*, CD000398.
- Batthyány, C., Bartesaghi, S., Mastrogiovanni, M., Lima, A., Demicheli, V., and Radi, R. (2017). Tyrosine-Nitrated Proteins: Proteomic and Bioanalytical Aspects. *Antioxid. Redox Signal.* *26*, 313–328.
- Baudry, M., Greget, R., Pernot, F., Bouteiller, J.-M., and Xiaoning, B. (2012). Roles of group I metabotropic glutamate receptors under physiological conditions and in neurodegeneration. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* *1*, 523–532.
- Beal, C.C. (2010). Gender and stroke symptoms: a review of the current literature. *J. Neurosci. Nurs. J. Am. Assoc. Neurosci. Nurses* *42*, 80–87.
- Becker, K.J. (1998). Inflammation and acute stroke. *Curr. Opin. Neurol.* *11*, 45.
- Becker, D.A., Ley, J.J., Echegoyen, L., and Alvarado, R. (2002). Stilbazulenyl nitronyl (STAZN): a nitronyl-substituted hydrocarbon with the potency of classical phenolic chain-breaking antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 4678–4684.

- Becker, M.A., Kisicki, J., Khosravan, R., Wu, J., Mulford, D., Hunt, B., MacDonald, P., and Joseph-Ridge, N. (2004). Febuxostat (TMX-67), a novel, non-purine, selective inhibitor of xanthine oxidase, is safe and decreases serum urate in healthy volunteers. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23, 1111–1116.
- Beckman, J.S., and Koppenol, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271, C1424-1437.
- Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313.
- Béjot, Y., Daubail, B., and Giroud, M. (2016a). Epidemiology of stroke and transient ischemic attacks: Current knowledge and perspectives. *Rev. Neurol. (Paris)* 172, 59–68.
- Béjot, Y., Bailly, H., Durier, J., and Giroud, M. (2016b). Epidemiology of stroke in Europe and trends for the 21st century. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983 45, e391–e398.
- Benchenane, K., Berezowski, V., Fernández-Monreal, M., Brillault, J., Valable, S., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., Vivien, D., Touzani, O., and Ali, C. (2005). Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain barrier from an LRP-dependent to an increased LRP-independent process. *Stroke* 36, 1065–1070.
- Benjamin Emelia J., Virani Salim S., Callaway Clifton W., Chamberlain Alanna M., Chang Alexander R., Cheng Susan, Chiuve Stephanie E., Cushman Mary, Delling Francesca N., Deo Rajat, et al. (2018). Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 137, e67–e492.
- Bennett, C., Mohammed, F., Álvarez-Ciara, A., Nguyen, M.A., Dietrich, W.D., Rajguru, S.M., Streit, W.J., and Prasad, A. (2019). Neuroinflammation, oxidative stress, and blood-brain barrier (BBB) disruption in acute Utah electrode array implants and the effect of deferoxamine as an iron chelator on acute foreign body response. *Biomaterials* 188, 144–159.
- Beray-Berthat, V., Croci, N., Plotkine, M., and Margail, I. (2003). Polymorphonuclear neutrophils contribute to infarction and oxidative stress in the cortex but not in the striatum after ischemia-reperfusion in rats. *Brain Res.* 987, 32–38.
- Berdichevsky, E., Riveros, N., Sánchez-Armáss, S., and Orrego, F. (1983). Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. *Neurosci. Lett.* 36, 75–80.
- Berkhemer, O.A., Fransen, P.S.S., Beumer, D., van den Berg, L.A., Lingsma, H.F., Yoo, A.J., Schonewille, W.J., Vos, J.A., Nederkoorn, P.J., Wermer, M.J.H., et al. (2015). A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 372, 11–20.
- Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316.
- Besancon, E., Guo, S., Lok, J., Tymianski, M., and Lo, E.H. (2008). Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 268–275.

Betzen, C., White, R., Zehendner, C.M., Pietrowski, E., Bender, B., Luhmann, H.J., and Kuhlmann, C.R.W. (2009). Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium. *Free Radic. Biol. Med.* *47*, 1212–1220.

Bhatia, R., Hill, M.D., Shobha, N., Menon, B., Bal, S., Kochar, P., Watson, T., Goyal, M., and Demchuk, A.M. (2010). Low rates of acute recanalization with intravenous recombinant tissue plasminogen activator in ischemic stroke: real-world experience and a call for action. *Stroke* *41*, 2254–2258.

Bhowmick, T., Berk, E., Cui, X., Muzykantov, V.R., and Muro, S. (2012). Effect of flow on endothelial endocytosis of nanocarriers targeted to ICAM-1. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *157*, 485–492.

Bianco, C.L., Chavez, T.A., Sosa, V., Saund, S.S., Nguyen, Q.N.N., Tantillo, D.J., Ichimura, A.S., Toscano, J.P., and Fukuto, J.M. (2016). The chemical biology of the persulfide (RSSH)/perthiyl (RSS·) redox couple and possible role in biological redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* *101*, 20–31.

Biffi, A., Anderson, C.D., Battey, T.W.K., Ayres, A.M., Greenberg, S.M., Viswanathan, A., and Rosand, J. (2015). Association Between Blood Pressure Control and Risk of Recurrent Intracerebral Hemorrhage. *JAMA* *314*, 904–912.

Bloom, B.J., Miller, L.C., and Blier, P.R. (2002). Soluble adhesion molecules in pediatric rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* *29*, 832–836.

Bobo, D., Robinson, K.J., Islam, J., Thurecht, K.J., and Corrie, S.R. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* *33*, 2373–2387.

Böggemeyer, E., Stehle, T., Schaible, U.E., Hahne, M., Vestweber, D., and Simon, M.M. (1994). *Borrelia burgdorferi* Upregulates the Adhesion Molecules E-selectin, P-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on Mouse Endothelioma Cells in vitro. *Cell Adhes. Commun.* *2*, 145–157.

Bonanata, J., Turell, L., Antmann, L., Ferrer-Sueta, G., Botasini, S., Méndez, E., Alvarez, B., and Coitiño, E.L. (2017). The thiol of human serum albumin: Acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid. *Free Radic. Biol. Med.* *108*, 952–962.

Borst, J.W., Visser, N.V., Kouptsova, O., and Visser, A.J. (2000). Oxidation of unsaturated phospholipids in membrane bilayer mixtures is accompanied by membrane fluidity changes. *Biochim. Biophys. Acta* *1487*, 61–73.

Boukai, A.I., Bunimovich, Y., Tahir-Kheli, J., Yu, J.-K., Goddard, W.A., and Heath, J.R. (2008). Silicon nanowires as efficient thermoelectric materials. *Nature* *451*, 168–171.

Boutin, H., LeFeuvre, R.A., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., and Rothwell, N.J. (2001). Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 5528–5534.

Bracad, S., Ducrocq, X., Mas, J.L., Soudant, M., Oppenheim, C., Moulin, T., Guillemin, F., and THRACE investigators (2016). Mechanical thrombectomy after intravenous alteplase versus alteplase alone after stroke (THRACE): a randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* *15*, 1138–1147.

Brand, M.D. (2016). Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* *100*, 14–31.

Bras, C - AVC ischémique ou hémorragique ?, C.L. AVC ischémique ou hémorragique ?

- Brazzelli, M., Sandercock, P.A., Chappell, F.M., Celani, M.G., Righetti, E., Arestis, N., Wardlaw, J.M., and Deeks, J.J. (2009). Magnetic resonance imaging versus computed tomography for detection of acute vascular lesions in patients presenting with stroke symptoms. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD007424.
- Brazzelli, M., Chappell, F.M., Miranda, H., Shuler, K., Dennis, M., Sandercock, P.A.G., Muir, K., and Wardlaw, J.M. (2014). Diffusion-Weighted Imaging and Diagnosis of Transient Ischemic Attack. *Ann. Neurol.* *75*, 67–76.
- Brennan, A.M., Suh, S.W., Won, S.J., Narasimhan, P., Kauppinen, T.M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P.H., and Swanson, R.A. (2009). NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat. Neurosci.* *12*, 857–863.
- Brevetti, G., Schiano, V., and Chiariello, M. (2006). Cellular adhesion molecules and peripheral arterial disease. *Vasc. Med. Lond. Engl.* *11*, 39–47.
- Brigelius-Flohé, R., and Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* *1830*, 3289–3303.
- Britnell, S.R., Chillari, K.A., and Brown, J.N. (2018). The Role of Xanthine Oxidase Inhibitors in Patients with History of Stroke: A Systematic Review. *Curr. Vasc. Pharmacol.* *16*, 583–588.
- Broderick, J.P., Palesch, Y.Y., Demchuk, A.M., Yeatts, S.D., Khatri, P., Hill, M.D., Jauch, E.C., Jovin, T.G., Yan, B., Silver, F.L., et al. (2013). Endovascular Therapy after Intravenous t-PA versus t-PA Alone for Stroke. *N. Engl. J. Med.* *368*, 893–903.
- Brouns, R., Wauters, A., De Surgeloose, D., Mariën, P., and De Deyn, P.P. (2011). Biochemical markers for blood-brain barrier dysfunction in acute ischemic stroke correlate with evolution and outcome. *Eur. Neurol.* *65*, 23–31.
- BROWN, Spencer, and POUJOL, Christel (2011). Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie. *Microsc. Confocale Form. Perm. CNRS Gif-Sur-Yvette*.
- Bruinink, A., Wang, J., and Wick, P. (2015). Effect of particle agglomeration in nanotoxicology. *Arch. Toxicol.* *89*, 659–675.
- Brunser, A.M., Hoppe, A., Illanes, S., Díaz, V., Muñoz, P., Cárcamo, D., Olavarria, V., Valenzuela, M., and Lavados, P. (2013). Accuracy of diffusion-weighted imaging in the diagnosis of stroke in patients with suspected cerebral infarct. *Stroke* *44*, 1169–1171.
- Buelna-Chontal, M., and Zazueta, C. (2013). Redox activation of Nrf2 & NF-κB: a double end sword? *Cell. Signal.* *25*, 2548–2557.
- Buettner, G.R. (2011). Superoxide Dismutase in Redox Biology: The roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med. Chem.* *11*, 341–346.
- Burtea, C., Laurent, S., Port, M., Lancelot, E., Ballet, S., Rousseaux, O., Toubeau, G., Vander Elst, L., Corot, C., and Muller, R.N. (2009). Magnetic Resonance Molecular Imaging of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Inflammatory Lesions Using a Peptide-Vectorized Paramagnetic Imaging Probe. *J. Med. Chem.* *52*, 4725–4742.

- Bustamante, A., Giralt, D., Garcia-Bonilla, L., Campos, M., Rosell, A., and Montaner, J. (2012). Citicoline in pre-clinical animal models of stroke: a meta-analysis shows the optimal neuroprotective profile and the missing steps for jumping into a stroke clinical trial. *J. Neurochem.* *123*, 217–225.
- Buttini, M., Sauter, A., and Boddeke, H.W. (1994). Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *23*, 126–134.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., and Ravanat, J.-L. (2003). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.* *531*, 5–23.
- Cai Hua, and Harrison David G. (2000). Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ. Res.* *87*, 840–844.
- Campbell, B.C.V., Mitchell, P.J., and EXTEND-IA Investigators (2015). Endovascular therapy for ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* *372*, 2365–2366.
- Campbell, B.C.V., Mitchell, P.J., Churilov, L., Yassi, N., Kleinig, T.J., Dowling, R.J., Yan, B., Bush, S.J., Dewey, H.M., Thijs, V., et al. (2018). Tenecteplase versus Alteplase before Thrombectomy for Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* *378*, 1573–1582.
- Campbell, L.A., Rosenfeld, M., and Kuo, C.-C. (2000). The role of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis – recent evidence from animal models. *Trends Microbiol.* *8*, 255–257.
- Cao, C., Leng, Y., and Kufe, D. (2003). Catalase Activity Is Regulated by c-Abl and Arg in the Oxidative Stress Response. *J. Biol. Chem.* *278*, 29667–29675.
- Carballal, S., Radi, R., Kirk, M.C., Barnes, S., Freeman, B.A., and Alvarez, B. (2003). Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry* *42*, 9906–9914.
- Carlander, U., Moto, T.P., Desalegn, A.A., Yokel, R.A., and Johanson, G. (2018). Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoceria systemic distribution in rats suggests dose- and route-dependent biokinetics. *Int. J. Nanomedicine* *13*, 2631–2646.
- Carlos, T.M., and Harlan, J.M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* *84*, 2068–2101.
- Carman, C.V., and Springer, T.A. (2008). Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 533–540.
- Carman, C.V., Sage, P.T., Sciuto, T.E., de la Fuente, M.A., Geha, R.S., Ochs, H.D., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., and Springer, T.A. (2007). Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* *26*, 784–797.
- Carroll, J.E., Howard, E.F., Hess, D.C., Wakade, C.G., Chen, Q., and Cheng, C. (1998). Nuclear factor-kappa B activation during cerebral reperfusion: effect of attenuation with N-acetylcysteine treatment. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *56*, 186–191.
- de Carvalho, D.D., Sadok, A., Bourgarel-Rey, V., Gattacceca, F., Penel, C., Lehmann, M., and Kovacic, H. (2008). Nox1 downstream of 12-lipoxygenase controls cell proliferation but not cell spreading of colon cancer cells. *Int. J. Cancer* *122*, 1757–1764.

- Caster, J.M., Patel, A.N., Zhang, T., and Wang, A. (2017). Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* *9*.
- Castillo, J., Alvarez-Sabín, J., Martínez-Vila, E., Montaner, J., Sobrino, T., Vivancos, J., and MITICO Study Investigators (2009). Inflammation markers and prediction of post-stroke vascular disease recurrence: the MITICO study. *J. Neurol.* *256*, 217–224.
- Catanese, L., Tarsia, J., and Fisher, M. (2017). Acute Ischemic Stroke Therapy Overview. *Circ. Res.* *120*, 541–558.
- Celardo, I., De Nicola, M., Mandoli, C., Pedersen, J.Z., Traversa, E., and Ghibelli, L. (2011). Ce³⁺ ions determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano* *5*, 4537–4549.
- Cerutti, C., and Ridley, A.J. (2017). Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp. Cell Res.* *358*, 31–38.
- Chan, J.M., Zhang, L., Yuet, K.P., Liao, G., Rhee, J.-W., Langer, R., and Farokhzad, O.C. (2009). PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials* *30*, 1627–1634.
- Chang, C.-W., Lai, M.-C., Cheng, T.-J., Lau, M.-T., and Hu, M.-L. (1998). Plasma Levels of Antioxidant Vitamins, Selenium, Total Sulfhydryl Groups and Oxidative Products in Ischemic-Stroke Patients as Compared to Matched Controls in Taiwan. *Free Radic. Res.* *28*, 15–24.
- Chattopadhyay, R., Tinnikov, A., Dyukova, E., Singh, N.K., Kotla, S., Mobley, J.A., and Rao, G.N. (2015). 12/15-Lipoxygenase-dependent ROS production is required for diet-induced endothelial barrier dysfunction. *J. Lipid Res.* *56*, 562–577.
- Chaudière, J., and Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* *37*, 949–962.
- Che, M., Wang, R., Wang, H.-Y., and Zheng, X.F.S. (2016). Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov. Today* *21*, 143–149.
- Chen, B.-H., and Stephen Inbaraj, B. (2018). Various physicochemical and surface properties controlling the bioactivity of cerium oxide nanoparticles. *Crit. Rev. Biotechnol.* *38*, 1003–1024.
- Chen, C.-A., Wang, T.-Y., Varadharaj, S., Reyes, L.A., Hemann, C., Talukder, M.A.H., Chen, Y.-R., Druhan, L.J., and Zweier, J.L. (2010). S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature* *468*, 1115–1118.
- Chen, H., Song, Y.S., and Chan, P.H. (2009). Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *29*, 1262–1272.
- Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2008). Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *294*, C460-466.
- Chen, S., Hou, Y., Cheng, G., Zhang, C., Wang, S., and Zhang, J. (2013). Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from apoptosis induced by oxidative stress. *Biol. Trace Elem. Res.* *154*, 156–166.

- Chen, Z., Mou, R., Feng, D., Wang, Z., and Chen, G. (2017). The role of nitric oxide in stroke. *Med. Gas Res.* 7, 194–203.
- Cherubini, A., Polidori, M.C., Bregnocchi, M., Pezzuto, S., Cecchetti, R., Ingegneri, T., di Iorio, A., Senin, U., and Mecocci, P. (2000). Antioxidant profile and early outcome in stroke patients. *Stroke* 31, 2295–2300.
- Chevilly, A., Lesept, F., Lenoir, S., Ali, C., Parcq, J., and Vivien, D. (2015). Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 415.
- Chevreul, K., Durand-Zaleski, I., Gouépo, A., Fery-Lemonnier, E., Hommel, M., and Woimant, F. (2013). Cost of stroke in France. *Eur. J. Neurol.* 20, 1094–1100.
- Cho, K.-J., Seo, J.-M., and Kim, J.-H. (2011). Bioactive Lipoxygenase Metabolites Stimulation of NADPH Oxidases and Reactive Oxygen Species. *Mol. Cells* 32, 1–5.
- Choi, D.W., and Rothman, S.M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13, 171–182.
- Choi, Y.H., and Han, H.-K. (2018). Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics. *J. Pharm. Investig.* 48, 43–60.
- Choi, D.-H., Kim, J.-H., Lee, K.-H., Kim, H.-Y., Kim, Y.-S., Choi, W.S., and Lee, J. (2015a). Role of neuronal NADPH oxidase 1 in the peri-infarct regions after stroke. *PLoS One* 10, e0116814.
- Choi, K.-H., Park, M.-S., Kim, H.-S., Kim, K.-T., Kim, H.-S., Kim, J.-T., Kim, B.-C., Kim, M.-K., Park, J.-T., and Cho, K.-H. (2015b). Alpha-lipoic acid treatment is neurorestorative and promotes functional recovery after stroke in rats. *Mol. Brain* 8, 9.
- Choi-Kwon, S., Park, K.-A., Lee, H.-J., Park, M.-S., Lee, J.-H., Jeon, S.-E., Choe, M.-A., and Park, K.-C. (2004). Temporal changes in cerebral antioxidant enzyme activities after ischemia and reperfusion in a rat focal brain ischemia model: effect of dietary fish oil. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 152, 11–18.
- Chouchani, E.T., Methner, C., Nadtochiy, S.M., Logan, A., Pell, V.R., Ding, S., James, A.M., Cochemé, H.M., Reinhold, J., Lilley, K.S., et al. (2013). Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat. Med.* 19, 753–759.
- Christou, I., Alexandrov, A.V., Burgin, W.S., Wojner, A.W., Felberg, R.A., Malkoff, M., and Grotta, J.C. (2000). Timing of recanalization after tissue plasminogen activator therapy determined by transcranial doppler correlates with clinical recovery from ischemic stroke. *Stroke* 31, 1812–1816.
- Chung, J.-W., Park, S.H., Kim, N., Kim, W.-J., Park, J.H., Ko, Y., Yang, M.H., Jang, M.S., Han, M.-K., Jung, C., et al. (2014). Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) classification and vascular territory of ischemic stroke lesions diagnosed by diffusion-weighted imaging. *J. Am. Heart Assoc.* 3.
- Cillard, J., and Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Ol. Corps Gras Lipides* 13, 24–29.
- Cimini, A., D'Angelo, B., Das, S., Gentile, R., Benedetti, E., Singh, V., Monaco, A.M., Santucci, S., and Seal, S. (2012). Antibody-conjugated PEGylated cerium oxide nanoparticles for specific targeting of A β aggregates modulate neuronal survival pathways. *Acta Biomater.* 8, 2056–2067.

- Clark, A., Zhu, A., Sun, K., and Petty, H.R. (2011). Cerium oxide and platinum nanoparticles protect cells from oxidant-mediated apoptosis. *J. Nanoparticle Res. Interdiscip. Forum Nanoscale Sci. Technol.* *13*, 5547–5555.
- Close, T.E., Cepinskas, G., Omatsu, T., Rose, K.L., Summers, K., Patterson, E.K., and Fraser, D.D. (2013). Diabetic ketoacidosis elicits systemic inflammation associated with cerebrovascular endothelial cell dysfunction. *Microcirc. N. Y. N 1994* *20*, 534–543.
- Collins, R., Reith, C., Emberson, J., Armitage, J., Baigent, C., Blackwell, L., Blumenthal, R., Danesh, J., Smith, G.D., DeMets, D., et al. (2016). Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *The Lancet* *388*, 2532–2561.
- Cook-Mills, J.M., Marchese, M.E., and Abdala-Valencia, H. (2011). Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 1607–1638.
- Costa, E.D., Rezende, B.A., Cortes, S.F., and Lemos, V.S. (2016). Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases. *Front. Physiol.* *7*, 206.
- Coull, A.J., Lovett, J.K., and Rothwell, P.M. (2004). Population based study of early risk of stroke after transient ischaemic attack or minor stroke: implications for public education and organisation of services. *BMJ*.
- Cronin, C.A. (2010). Intravenous tissue plasminogen activator for stroke: a review of the ECASS III results in relation to prior clinical trials. *J. Emerg. Med.* *38*, 99–105.
- Cui, J., Holmes, E.H., Greene, T.G., and Liu, P.K. (2000). Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *14*, 955–967.
- Cybulsky, M.I., Iiyama, K., Li, H., Zhu, S., Chen, M., Iiyama, M., Davis, V., Gutierrez-Ramos, J.C., Connelly, P.W., and Milstone, D.S. (2001). A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* *107*, 1255–1262.
- Daiber, A., Daub, S., Bachschmid, M., Schildknecht, S., Oelze, M., Steven, S., Schmidt, P., Megner, A., Wada, M., Tanabe, T., et al. (2013). Protein tyrosine nitration and thiol oxidation by peroxynitrite-strategies to prevent these oxidative modifications. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 7542–7570.
- D’Amelio, M., Terruso, V., Famoso, G., Di Benedetto, N., Realmuto, S., Valentino, F., Ragonese, P., Savettieri, G., and Aridon, P. (2014). Early and late mortality of spontaneous hemorrhagic transformation of ischemic stroke. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* *23*, 649–654.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., and Mozafari, M.R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* *10*.
- Danton, G.H., and Dietrich, W.D. (2003). Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *62*, 127–136.
- Das, M., Patil, S., Bhargava, N., Kang, J.-F., Riedel, L.M., Seal, S., and Hickman, J.J. (2007). Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials* *28*, 1918–1925.

Das, S., Singh, S., Dowding, J.M., Oommen, S., Kumar, A., Sayle, T.X.T., Saraf, S., Patra, C.R., Vlahakis, N.E., Sayle, D.C., et al. (2012). The induction of angiogenesis by cerium oxide nanoparticles through the modulation of oxygen in intracellular environments. *Biomaterials* 33, 7746–7755.

Das, S., Dowding, J.M., Klump, K.E., McGinnis, J.F., Self, W., and Seal, S. (2013). Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine. *Nanomed.* 8, 1483–1508.

Dávalos, A., Castillo, J., Alvarez-Sabín, J., Secades, J.J., Mercadal, J., López, S., Cobo, E., Warach, S., Sherman, D., Clark, W.M., et al. (2002). Oral citicoline in acute ischemic stroke: an individual patient data pooling analysis of clinical trials. *Stroke* 33, 2850–2857.

Dávalos, A., Alvarez-Sabín, J., Castillo, J., Díez-Tejedor, E., Ferro, J., Martínez-Vila, E., Serena, J., Segura, T., Cruz, V.T., Masjuan, J., et al. (2012). Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial). *Lancet Lond. Engl.* 380, 349–357.

Davies, M.J. (2004). Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 17–25.

Davies, M.J. (2011). Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 48, 8–19.

Davies, M.J., Fu, S., and Dean, R.T. (1995). Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals. *Biochem. J.* 305, 643–649.

Davis, A.S., Zhao, H., Sun, G.H., Sapolsky, R.M., and Steinberg, G.K. (2007). Gene therapy using SOD1 protects striatal neurons from experimental stroke. *Neurosci. Lett.* 411, 32–36.

Dawson, J., Quinn, T.J., Harrow, C., Lees, K.R., and Walters, M.R. (2009). The effect of allopurinol on the cerebral vasculature of patients with subcortical stroke; a randomized trial. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 68, 662–668.

De Meyer, S.F., Denorme, F., Langhauser, F., Geuss, E., Fluri, F., and Kleinschnitz, C. (2016). Thromboinflammation in Stroke Brain Damage. *Stroke* 47, 1165–1172.

De Silva, T.M., Brait, V.H., Drummond, G.R., Sobey, C.G., and Miller, A.A. (2011). Nox2 Oxidase Activity Accounts for the Oxidative Stress and Vasomotor Dysfunction in Mouse Cerebral Arteries following Ischemic Stroke. *PLoS ONE* 6.

Deb, P., Sharma, S., and Hassan, K.M. (2010). Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiol. Off. J. Int. Soc. Pathophysiol.* 17, 197–218.

DeGraba, T.J. (1998). The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology* 51, S62–68.

Dejana, E. (2006). The transcellular railway: insights into leukocyte diapedesis. *Nat. Cell Biol.* 8, 105–107.

Del Zoppo, G.J., Saver, J.L., Jauch, E.C., Adams, H.P., and American Heart Association Stroke Council (2009). Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: a science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 40, 2945–2948.

- DeMaster, E.G., Quast, B.J., Redfern, B., and Nagasawa, H.T. (1995). Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide. *Biochemistry* *34*, 11494–11499.
- Demirkaya, S., Topcuoglu, M.A., Aydin, A., Ulas, U.H., Isimer, A.I., and Vural, O. (2001). Malondialdehyde, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in peripheral blood erythrocytes of patients with acute cerebral ischemia. *Eur. J. Neurol.* *8*, 43–51.
- Deng, J., Mei, H., Shi, W., Pang, Z.-Q., Zhang, B., Guo, T., Wang, H.-F., Jiang, X.-G., and Hu, Y. (2018). Recombinant Tissue Plasminogen Activator-conjugated Nanoparticles Effectively Targets Thrombolysis in a Rat Model of Middle Cerebral Artery Occlusion. *Curr. Med. Sci.* *38*, 427–435.
- DeNucci, C.C., Pagán, A.J., Mitchell, J.S., and Shimizu, Y. (2010). Control of alpha4beta7 integrin expression and CD4 T cell homing by the beta1 integrin subunit. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 2458–2467.
- Derex, L., Paris, C., and Nighoghossian, N. (2018). Combining Intravenous Thrombolysis and Antithrombotic Agents in Stroke: An Update. *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* *7*.
- DeRidder, M.N., Simon, M.J., Siman, R., Auberson, Y.P., Raghupathi, R., and Meaney, D.F. (2006). Traumatic mechanical injury to the hippocampus in vitro causes regional caspase-3 and calpain activation that is influenced by NMDA receptor subunit composition. *Neurobiol. Dis.* *22*, 165–176.
- Derjaguin, B.V., Churaev, N.V., and Muller, V.M. (1987). The Derjaguin—Landau—Verwey—Overbeek (DLVO) Theory of Stability of Lyophobic Colloids. In *Surface Forces*, B.V. Derjaguin, N.V. Churaev, and V.M. Muller, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 293–310.
- Deshpande, S., Patil, S., Kuchibhatla, S.V., and Seal, S. (2005). Size dependency variation in lattice parameter and valency states in nanocrystalline cerium oxide. *Appl. Phys. Lett.* *87*, 133113.
- Di Carlo, A. (2009). Human and economic burden of stroke. *Age Ageing* *38*, 4–5.
- Di Meo, S., Reed, T.T., Venditti, P., and Victor, V.M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*, 1245049.
- Di Napoli, M. (2001). Early inflammatory response in ischemic stroke. *Thromb. Res.* *103*, 261–264.
- Di Napoli, M., Di Gianfilippo, G., and Bocola, V. (1999). C-Reactive protein, serum amyloid A protein, and coronary events. *Circulation* *100*, e66.
- Diaz, L.A., Valenzuela-Muñiz, A., Muthuvel, M., and Botte, G.G. (2013). Analysis of ammonia electro-oxidation kinetics using a rotating disk electrode. *Electrochimica Acta* *89*, 413–421.
- Diaz, M., Dopido, R., Gomez, T., and Rodriguez, C. (2016). Membrane lipid microenvironment modulates thermodynamic properties of the Na⁺-K⁺-ATPase in branchial and intestinal epithelia in euryhaline fish in vivo. *Front. Physiol.* *7*.
- Diener, H.-C., Lees, K.R., Lyden, P., Grotta, J., Davalos, A., Davis, S.M., Shuaib, A., Ashwood, T., Wasiewski, W., Alderfer, V., et al. (2008). NXY-059 for the treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke* *39*, 1751–1758.
- Dirnagl, U. (2006). Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *26*, 1465–1478.

- Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391–397.
- Dizdaroğlu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., and Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1102–1115.
- Dobrian, A.D., Lieb, D.C., Cole, B.K., Taylor-Fishwick, D.A., Chakrabarti, S.K., and Nadler, J.L. (2011). Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Prog. Lipid Res.* 50, 115–131.
- Domínguez, L., Sosa-Peinado, A., and Hansberg, W. (2010). Catalase evolved to concentrate H₂O₂ at its active site. *Arch. Biochem. Biophys.* 500, 82–91.
- Dong, Y., and Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180–190.
- Donkor, D.A., and Tang, X.S. (2014). Tube length and cell type-dependent cellular responses to ultra-short single-walled carbon nanotube. *Biomaterials* 35, 3121–3131.
- Doré, S., Otsuka, T., Mito, T., Sugo, N., Hand, T., Wu, L., Hurn, P.D., Traystman, R.J., and Andreasson, K. (2003). Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 increases cerebral infarction. *Ann. Neurol.* 54, 155–162.
- Dowding, J.M., Dosani, T., Kumar, A., Seal, S., and Self, W.T. (2012). Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical (·NO). *Chem. Commun. Camb. Engl.* 48, 4896–4898.
- Dowding, J.M., Seal, S., and Self, W.T. (2013). Cerium oxide nanoparticles accelerate the decay of peroxynitrite (ONOO(-)). *Drug Deliv. Transl. Res.* 3, 375–379.
- Dowding, J.M., Song, W., Bossy, K., Karakoti, A., Kumar, A., Kim, A., Bossy, B., Seal, S., Ellisman, M.H., Perkins, G., et al. (2014). Cerium oxide nanoparticles protect against A β -induced mitochondrial fragmentation and neuronal cell death. *Cell Death Differ.* 21, 1622–1632.
- Doyle, K.P., Simon, R.P., and Stenzel-Poore, M.P. (2008). Neuropharmacology – Special Issue on Cerebral Ischemia Mechanisms of Ischemic Brain Damage – Review Article. *Neuropharmacology* 55, 310–318.
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62, 649–671.
- Dröse, S., Stepanova, A., and Galkin, A. (2016). Ischemic A/D transition of mitochondrial complex I and its role in ROS generation. *Biochim. Biophys. Acta* 1857, 946–957.
- Drummond, G.R., and Sobey, C.G. (2014). Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 25, 452–463.
- Ducruet, A.F., Mack, W.J., Mocco, J., Hoh, D.J., Coon, A.L., D’Ambrosio, A.L., Winfree, C.J., Pinsky, D.J., and Connolly, E.S. (2011). Preclinical evaluation of postischemic dehydroascorbic Acid administration in a large-animal stroke model. *Transl. Stroke Res.* 2, 399–403.
- Dupuy, C., Virion, A., Ohayon, R., Kaniewski, J., Dème, D., and Pommier, J. (1991). Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 266, 3739–3743.
- Dutta, P., Pal, S., Seehra, M.S., Shi, Y., Eyring, E.M., and Ernst, R.D. (2006). Concentration of Ce³⁺ and Oxygen Vacancies in Cerium Oxide Nanoparticles. *Chem. Mater.* 18, 5144–5146.

- Edaravone Acute Infarction Study Group (2003). Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* *15*, 222–229.
- Edvinsson, Mackenzie, and McCulloch J (2002). *Cerebral Blood Flow and Metabolism* (Lippincott Williams and Wilkins).
- Egea, J., Fabregat, I., Frapart, Y.M., Ghezzi, P., Görlach, A., Kietzmann, T., Kubaichuk, K., Knaus, U.G., Lopez, M.G., Olaso-Gonzalez, G., et al. (2017). European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biol.* *13*, 94–162.
- Eitan, E., Hutchison, E.R., Greig, N.H., Tweedie, D., Celik, H., Ghosh, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Sasaki, C.Y., Ghosh, P., et al. (2015). Combination therapy with lenalidomide and nanoceria ameliorates CNS autoimmunity. *Exp. Neurol.* *273*, 151–160.
- El Kossi, M.M., and Zakhary, M.M. (2000). Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke* *31*, 1889–1892.
- Eliasson, M.J., Huang, Z., Ferrante, R.J., Sasamata, M., Molliver, M.E., Snyder, S.H., and Moskowitz, M.A. (1999). Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 5910–5918.
- Elsner, M., Gehrman, W., and Lenzen, S. (2011). Peroxisome-generated hydrogen peroxide as important mediator of lipotoxicity in insulin-producing cells. *Diabetes* *60*, 200–208.
- Emberson, J., Lees, K.R., Lyden, P., Blackwell, L., Albers, G., Bluhmki, E., Brott, T., Cohen, G., Davis, S., Donnan, G., et al. (2014). Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *The Lancet* *384*, 1929–1935.
- Emsley, H.C.A., and Tyrrell, P.J. (2002). Inflammation and infection in clinical stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *22*, 1399–1419.
- Escudero Augusto, D., Marqués Alvarez, L., and Taboada Costa, F. (2008). [Up-date in spontaneous cerebral hemorrhage]. *Med. Intensiva* *32*, 282–295.
- Espinoza, S.E., Guo, H., Fedarko, N., DeZern, A., Fried, L.P., Xue, Q.-L., Leng, S., Beamer, B., and Walston, J.D. (2008). Glutathione peroxidase enzyme activity in aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *63*, 505–509.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* *11*, 81–128.
- Estevez, A.Y., Pritchard, S., Harper, K., Aston, J.W., Lynch, A., Lucky, J.J., Ludington, J.S., Chatani, P., Mosenthal, W.P., Leiter, J.C., et al. (2011). Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* *51*, 1155–1163.
- Evans, M.R.B., White, P., Cowley, P., and Werring, D.J. (2017). Revolution in acute ischaemic stroke care: a practical guide to mechanical thrombectomy. *Pract. Neurol.* *17*, 252–265.

- Fabian, R.H., and Kent, T.A. (1999). Superoxide anion production during reperfusion is reduced by an antineutrophil antibody after prolonged cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* *26*, 355–361.
- Fabian, R.H., DeWitt, D.S., and Kent, T.A. (1995). In vivo Detection of Superoxide Anion Production by the Brain Using a Cytochrome c Electrode. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *15*, 242–247.
- Faraci, F.M. (2006). Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 *100*, 739–743.
- FDA Novel Drug Approvals for 2018, C. for D.E. and Novel Drug Approvals for 2018. FDA.
- Feigin, V.L., Forouzanfar, M.H., Krishnamurthi, R., Mensah, G.A., Connor, M., Bennett, D.A., Moran, A.E., Sacco, R.L., Anderson, L., Truelsen, T., et al. (2014). Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond. Engl.* *383*, 245–254.
- Feigin, V.L., Roth, G.A., Naghavi, M., Parmar, P., Krishnamurthi, R., Chugh, S., Mensah, G.A., Norrving, B., Shiue, I., Ng, M., et al. (2016). Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Neurol.* *15*, 913–924.
- Fernandes, A.P., and Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox Signal.* *6*, 63–74.
- Ferretti, M.T., Merlini, M., Späni, C., Gericke, C., Schweizer, N., Enzmann, G., Engelhardt, B., Kulic, L., Suter, T., and Nitsch, R.M. (2016). T-cell brain infiltration and immature antigen-presenting cells in transgenic models of Alzheimer’s disease-like cerebral amyloidosis. *Brain. Behav. Immun.* *54*, 211–225.
- Fialkow, L., Wang, Y., and Downey, G.P. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.* *42*, 153–164.
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* *194*, 7–15.
- Fisher, M., and Saver, J.L. (2015). Future directions of acute ischaemic stroke therapy. *Lancet Neurol.* *14*, 758–767.
- Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D.W., Hurn, P.D., Kent, T.A., Savitz, S.I., Lo, E.H., and STAIR Group (2009). Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* *40*, 2244–2250.
- Fitzpatrick, F.A. (2004). Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr. Pharm. Des.* *10*, 577–588.
- Flamm, E.S., Demopoulos, H.B., Seligman, M.L., Poser, R.G., and Ransohoff, J. (1978). Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke* *9*, 445–447.
- Flohé, L. (2016). The impact of thiol peroxidases on redox regulation. *Free Radic. Res.* *50*, 126–142.
- Fonarow, G.C., Zhao, X., Smith, E.E., Saver, J.L., Reeves, M.J., Bhatt, D.L., Xian, Y., Hernandez, A.F., Peterson, E.D., and Schwamm, L.H. (2014). Door-to-needle times for tissue plasminogen activator administration and clinical outcomes in acute ischemic stroke before and after a quality improvement initiative. *JAMA* *311*, 1632–1640.

- Forman, H.J. (2016). Redox signaling: An evolution from free radicals to aging. *Free Radic. Biol. Med.* 97, 398–407.
- Forman, H.J., Ursini, F., and Maiorino, M. (2014). An overview of mechanisms of redox signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 0, 2–9.
- Forster, C., Clark, H.B., Ross, M.E., and Iadecola, C. (1999). Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 97, 215–220.
- Förstermann, U. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch.* 459, 923–939.
- Förstermann, U., and Münzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113, 1708–1714.
- Förstermann, U., and Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–837.
- Fotis, L., Agrogiannis, G., Vlachos, I.S., Pantopoulou, A., Margoni, A., Kostaki, M., Verikokos, C., Tzivras, D., Mikhailidis, D.P., and Perrea, D. (2012). Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model. *Vivo Athens Greece* 26, 243–250.
- Francis, J.W., Ren, J., Warren, L., Brown, R.H., and Finklestein, S.P. (1997). Postischemic infusion of Cu/Zn superoxide dismutase or SOD:Tet451 reduces cerebral infarction following focal ischemia/reperfusion in rats. *Exp. Neurol.* 146, 435–443.
- Fratelli, L., Freyssenge, J., Claustre, C., Buisson, M., Bischoff, M., Nighoghossian, N., Derex, L., El Khoury, C., and behalf of the RESUVal Group, O. (2019). Sex-Related Differences in Management and Outcome of Acute Ischemic Stroke in Eligible Patients to Thrombolysis. *Cerebrovasc. Dis.* 47, 196–204.
- Fréchou, M., Beray-Berthat, V., Raynaud, J.-S., Mériaux, S., Gombert, F., Lancelot, E., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., Ballet, S., Robert, P., et al. (2013). Detection of vascular cell adhesion molecule-1 expression with USPIO-enhanced molecular MRI in a mouse model of cerebral ischemia. *Contrast Media Mol. Imaging* 8, 157–164.
- Freedman, A.S., Munro, J.M., Rice, G.E., Bevilacqua, M.P., Morimoto, C., McIntyre, B.W., Rhyhart, K., Pober, J.S., and Nadler, L.M. (1990). Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and ICAM-110. *Science* 249, 1030–1033.
- Freudenthal, B.D., Beard, W.A., Perera, L., Shock, D.D., Kim, T., Schlick, T., and Wilson, S.H. (2015). Uncovering the polymerase-induced cytotoxicity of an oxidized nucleotide. *Nature* 517, 635–639.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272, 18515–18517.
- Frijns C.J.M., and Kappelle L.J. (2002). Inflammatory Cell Adhesion Molecules in Ischemic Cerebrovascular Disease. *Stroke* 33, 2115–2122.
- Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 7, 5577–5591.

- Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Noshita, N., Sugawara, T., Kawase, M., and Chan, P.H. (2000). The Cytosolic Antioxidant Copper/Zinc-Superoxide Dismutase Prevents the Early Release of Mitochondrial Cytochrome c in Ischemic Brain after Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice. *J. Neurosci.* *20*, 2817–2824.
- Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 1583–1606.
- Furukawa, K., Fu, W., Li, Y., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., and Mattson, M.P. (1997). The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 8178–8186.
- Gaberel, T., Gakuba, C., Zheng, Y., Lépine, M., Lo, E.H., and van Leyen, K. (2019). Impact of 12/15-Lipoxygenase on Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* *50*, 520–523.
- Gandolfo, C., Sandercock, P., and Conti, M. (2002). Lubeluzole for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD001924.
- Gao, H., Yang, Z., Zhang, S., Cao, S., Shen, S., Pang, Z., and Jiang, X. (2013). Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization. *Sci. Rep.* *3*, 2534.
- Gao, L., Zhuang, J., Nie, L., Zhang, J., Zhang, Y., Gu, N., Wang, T., Feng, J., Yang, D., Perrett, S., et al. (2007). Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* *2*, 577–583.
- Gao, Y., Chen, K., Ma, J.-L., and Gao, F. (2014). Cerium oxide nanoparticles in cancer. *OncoTargets Ther.* *7*, 835–840.
- Gao, Y., Chen, X., and Liu, H. (2018). A facile approach for synthesis of nano-CeO₂ particles loaded co-polymer matrix and their colossal role for blood-brain barrier permeability in Cerebral Ischemia. *J. Photochem. Photobiol. B* *187*, 184–189.
- Garaude, J., Acín-Pérez, R., Martínez-Cano, S., Enamorado, M., Ugolini, M., Nistal-Villán, E., Hervás-Stubbs, S., Pelegrín, P., Sander, L.E., Enríquez, J.A., et al. (2016). Mitochondrial respiratory-chain adaptations in macrophages contribute to antibacterial host defense. *Nat. Immunol.* *17*, 1037–1045.
- Garcia, V., and Sessa, W.C. (2019). Endothelial NOS: perspective and recent developments. *Br. J. Pharmacol.* *176*, 189–196.
- Garcia-Bonilla, L., Moore, J.M., Racchumi, G., Zhou, P., Butler, J.M., Iadecola, C., and Anrather, J. (2014). Inducible Nitric Oxide Synthase in Neutrophils and Endothelium Contributes to Ischemic Brain Injury in Mice. *J. Immunol.* 1400918.
- Ghaznavi, H., Najafi, R., Mehrzadi, S., Hosseini, A., Tekyemarroof, N., Shakeri-Zadeh, A., Rezayat, M., and Sharifi, A.M. (2015). Neuro-protective effects of cerium and yttrium oxide nanoparticles on high glucose-induced oxidative stress and apoptosis in undifferentiated PC12 cells. *Neurol. Res.* *37*, 624–632.
- Gieche, J., Mehlhase, J., Licht, A., Zacke, T., Sitte, N., and Grune, T. (2001). Protein oxidation and proteolysis in RAW264.7 macrophages: effects of PMA activation. *Biochim. Biophys. Acta* *1538*, 321–328.

Gil, D., Rodriguez, J., Ward, B., Vertegel, A., Ivanov, V., and Reukov, V. (2017). Antioxidant Activity of SOD and Catalase Conjugated with Nanocrystalline Ceria. *Bioengineering* 4, 18.

Ginsberg, M.D. (2007). Life after cerovive: a personal perspective on ischemic neuroprotection in the post-NXY-059 era. *Stroke* 38, 1967–1972.

Girouard, H., Wang, G., Gallo, E.F., Anrather, J., Zhou, P., Pickel, V.M., and Iadecola, C. (2009a). NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 2545–2552.

Girouard, H., Wang, G., Gallo, E.F., Anrather, J., Zhou, P., Pickel, V.M., and Iadecola, C. (2009b). NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 2545–2552.

Glorieux, C., and Calderon, P.B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol. Chem.* 398, 1095–1108.

Go, Y.-M., Chandler, J.D., and Jones, D.P. (2015). The cysteine proteome. *Free Radic. Biol. Med.* 84, 227–245.

Goenka, L., Uppugunduri Satyanarayana, C.R., S, S.K., and George, M. (2019). Neuroprotective agents in Acute Ischemic Stroke-A Reality Check. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 109, 2539–2547.

Goldstein, L.B., Jones, M.R., Matchar, D.B., Edwards, L.J., Hoff, J., Chilukuri, V., Armstrong, S.B., and Horner, R.D. (2001). Improving the reliability of stroke subgroup classification using the Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria. *Stroke* 32, 1091–1098.

Goldstein, L.B., Adams, R., Alberts, M.J., Appel, L.J., Brass, L.M., Bushnell, C.D., Culebras, A., Degra, T.J., Gorelick, P.B., Guyton, J.R., et al. (2006). Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Stroke* 37, 1583–1633.

Goldstein, L.B., Bushnell, C.D., Adams, R.J., Appel, L.J., Braun, L.T., Chaturvedi, S., Creager, M.A., Culebras, A., Eckel, R.H., Hart, R.G., et al. (2011). Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 42, 517–584.

Gonzalez, F.J. (2005). Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat. Res.* 569, 101–110.

Gosk, S., Moos, T., Gottstein, C., and Bendas, G. (2008). VCAM-1 directed immunoliposomes selectively target tumor vasculature in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 854–863.

Götz Thomalla, Claus Z. Simonsen, Florent Boutitie, Grethe Andersen, Yves Berthezene, Bastian Cheng, Bharath Cheripelli, Tae-Hee Cho, Franz Fazekas, Jens Fiehler, et al. (2018). MRI-Guided Thrombolysis for Stroke with Unknown Time of Onset. *N Engl J Med* 611–622.

Goyal, M., Demchuk, A.M., Menon, B.K., Eesa, M., Rempel, J.L., Thornton, J., Roy, D., Jovin, T.G., Willinsky, R.A., Sapkota, B.L., et al. (2015). Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 372, 1019–1030.

Goyal, M., Menon, B.K., van Zwam, W.H., Dippel, D.W.J., Mitchell, P.J., Demchuk, A.M., Dávalos, A., Majoie, C.B.L.M., van der Lugt, A., de Miquel, M.A., et al. (2016). Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet Lond. Engl.* 387, 1723–1731.

Graham, D., Huynh, N.N., Hamilton, C.A., Beattie, E., Smith, R.A.J., Cochemé, H.M., Murphy, M.P., and Dominiczak, A.F. (2009). Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ10 improves endothelial function and attenuates cardiac hypertrophy. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 54, 322–328.

Granger, D.N., Rutili, G., and McCord, J.M. (1981). Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81, 22–29.

Grau, A.J., Buggle, F., Lichy, C., Brandt, T., Becher, H., and Rudi, J. (2001). Helicobacter pylori infection as an independent risk factor for cerebral ischemia of atherothrombotic origin. *J. Neurol. Sci.* 186, 1–5.

Green, S.J., Mellouk, S., Hoffman, S.L., Meltzer, M.S., and Nacy, C.A. (1990). Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunol. Lett.* 25, 15–19.

Green, S.J., Scheller, L.F., Marletta, M.A., Seguin, M.C., Klotz, F.W., Slayter, M., Nelson, B.J., and Nacy, C.A. (1994). Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol. Lett.* 43, 87–94.

Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., and Langer, R. (1994). Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263, 1600–1603.

Gregersen, R., Lambertsen, K., and Finsen, B. (2000). Microglia and Macrophages Are the Major Source of Tumor Necrosis Factor in Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 53–65.

Grieb, P., Forster, R.E., Strome, D., Goodwin, C.W., and Pape, P.C. (1985). O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator-dilution technique. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 58, 1929–1941.

Gu, W., Zhao, H., Yenari, M.A., Sapolsky, R.M., and Steinberg, G.K. (2004). Catalase over-expression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. *Neuroreport* 15, 413–416.

Gu, Z., Kaul, M., Yan, B., Kridel, S.J., Cui, J., Strongin, A., Smith, J.W., Liddington, R.C., and Lipton, S.A. (2002). S-Nitrosylation of Matrix Metalloproteinases: Signaling Pathway to Neuronal Cell Death. *Science* 297, 1186–1190.

Guiraud, V., Amor, M.B., Mas, J.-L., and Touzé, E. (2010). Triggers of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 41, 2669–2677.

Guzik, T.J., West, N.E.J., Pillai, R., Taggart, D.P., and Channon, K.M. (2002). Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 39, 1088–1094.

- Hacisevki, A. (2009). AN OVERVIEW OF ASCORBIC ACID BIOCHEMISTRY. *Ank. Üniversitesi Eczacı Fakültesi Derg.* 38, 233–255.
- Hacke, W., Kaste, M., Fieschi, C., von Kummer, R., Davalos, A., Meier, D., Larrue, V., Bluhmki, E., Davis, S., Donnan, G., et al. (1998). Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet Lond. Engl.* 352, 1245–1251.
- Hacke, W., Davalos, A., Kummer, R. von, Kaste, M., and Larrue, V. (1999). ECASS-II: intravenous alteplase in acute ischaemic stroke. *The Lancet* 353, 67–68.
- Hacke, W., Donnan, G., Fieschi, C., Kaste, M., von Kummer, R., Broderick, J.P., Brott, T., Frankel, M., Grotta, J.C., Haley, E.C., et al. (2004). Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet Lond. Engl.* 363, 768–774.
- Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K.R., Medeghri, Z., Machnig, T., et al. (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 359, 1317–1329.
- Haley E. Clarke (1998). High-Dose Tirilazad for Acute Stroke (RANTTAS II). *Stroke* 29, 1256a–11257.
- Hall, D.J., Han, S.-H., Chepetan, A., Inui, E.G., Rogers, M., and Dugan, L.L. (2012). Dynamic optical imaging of metabolic and NADPH oxidase-derived superoxide in live mouse brain using fluorescence lifetime unmixing. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 23–32.
- Hall, J.R., Wiechmann, A.R., Johnson, L.A., Edwards, M., Barber, R.C., Winter, A.S., Singh, M., and O’Bryant, S.E. (2013). Biomarkers of Vascular Risk, Systemic Inflammation and Microvascular Pathology and Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 35, 363–371.
- Hallenbeck, J.M. (1996). Significance of the Inflammatory Response in Brain Ischemia. In *Mechanisms of Secondary Brain Damage in Cerebral Ischemia and Trauma*, A. Baethmann, O.S. Kempfski, N. Plesnila, and F. Staub, eds. (Springer Vienna), pp. 27–31.
- Hallgren, J., Jones, T.G., Abonia, J.P., Xing, W., Humbles, A., Austen, K.F., and Gurish, M.F. (2007). Pulmonary CXCR2 regulates VCAM-1 and antigen-induced recruitment of mast cell progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 20478–20483.
- Halliwell, B. (1999). Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutr. Rev.* 57, 104–113.
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiol.* 141, 312–322.
- Hankey, G.J. (2017). Stroke. *The Lancet* 389, 641–654.
- Hankey, G.J., and Blacker, D.J. (2015). Is it a stroke? *BMJ* 350, h56.
- Hardas, S.S., Butterfield, D.A., Sultana, R., Tseng, M.T., Dan, M., Florence, R.L., Unrine, J.M., Graham, U.M., Wu, P., Grulke, E.A., et al. (2010). Brain distribution and toxicological evaluation of a systemically delivered engineered nanoscale ceria. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 116, 562–576.

Hardas, S.S., Sultana, R., Warriar, G., Dan, M., Florence, R.L., Wu, P., Grulke, E.A., Tseng, M.T., Unrine, J.M., Graham, U.M., et al. (2012). Rat brain pro-oxidant effects of peripherally administered 5 nm ceria 30 days after exposure. *Neurotoxicology* 33, 1147–1155.

Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic. Biol. Med.* 33, 774–797.

Hart, R.G., Pearce, L.A., and Aguilar, M.I. (2007). Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann. Intern. Med.* 146, 857–867.

Harush-Frenkel, O., Rozentur, E., Benita, S., and Altschuler, Y. (2008). Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. *Biomacromolecules* 9, 435–443.

Hatano, S. (1976). Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report. *Bull. World Health Organ.* 54, 541–553.

Havel, H.A. (2016). Where Are the Nanodrugs? An Industry Perspective on Development of Drug Products Containing Nanomaterials. *AAPS J.* 18, 1351–1353.

He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., and Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31, 3657–3666.

He, Y.Y., Hsu, C.Y., Ezrin, A.M., and Miller, M.S. (1993). Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase in focal cerebral ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.* 265, H252-256.

Headlam, H.A., and Davies, M.J. (2002). Beta-scission of side-chain alkoxy radicals on peptides and proteins results in the loss of side-chains as aldehydes and ketones. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1171–1184.

Headlam, H.A., and Davies, M.J. (2003). Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 44–55.

Headlam, H.A., and Davies, M.J. (2004). Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1175–1184.

Heckert, E.G., Karakoti, A.S., Seal, S., and Self, W.T. (2008). The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials* 29, 2705–2709.

Heckman, K.L., DeCoteau, W., Estevez, A., Reed, K.J., Costanzo, W., Sanford, D., Leiter, J.C., Clauss, J., Knapp, K., Gomez, C., et al. (2013). Custom cerium oxide nanoparticles protect against a free radical mediated autoimmune degenerative disease in the brain. *ACS Nano* 7, 10582–10596.

Hempel, S.L., Buettner, G.R., O'Malley, Y.Q., Wessels, D.A., and Flaherty, D.M. (1999). Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 146–159.

Henry Ma, Bruce C.V. Campbell, Mark W. Parsons, Leonid Churilov, Christopher R. Levi, Chung Hsu, Timothy J. Kleinig, Tissa Wijeratne, Sami Curtze, Helen M. Dewey, et al. (2019). Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke | *NEJM. N Engl J Med* 1795–1803.

Henseleit, U., Steinbrink, K., Sunderkötter, C., Goebeler, M., Roth, J., and Sorg, C. (1994). Expression of murine VCAM-1 in vitro and in different models of inflammation in vivo: correlation with immigration of monocytes. *Exp. Dermatol.* *3*, 249–256.

Herculano-Houzel, S. (2011). Scaling of Brain Metabolism with a Fixed Energy Budget per Neuron: Implications for Neuronal Activity, Plasticity and Evolution. *PLOS ONE* *6*, e17514.

Herlofson, K., Heijnen, C.J., Lange, J., Alves, G., Tysnes, O.-B., Friedman, J.H., and Fagundes, C.P. (2018). Inflammation and fatigue in early, untreated Parkinson's Disease. *Acta Neurol. Scand.* *138*, 394–399.

Heron, M. (2011). Deaths: leading causes for 2007. *Natl. Vital Stat. Rep. Cent. Dis. Control Prev. Natl. Cent. Health Stat. Natl. Vital Stat. Syst.* *59*, 1–95.

Heuschmann, P.U., Berger, K., Misselwitz, B., Hermanek, P., Leffmann, C., Adelman, M., Buecker-Nott, H.-J., Rother, J., Neundoerfer, B., Kolominsky-Rabas, P.L., et al. (2003). Frequency of thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke and the risk of in-hospital mortality: the German Stroke Registers Study Group. *Stroke* *34*, 1106–1113.

Hijazi, Z., Lindbäck, J., Alexander, J.H., Hanna, M., Held, C., Hylek, E.M., Lopes, R.D., Oldgren, J., Siegbahn, A., Stewart, R.A.H., et al. (2016). The ABC (age, biomarkers, clinical history) stroke risk score: a biomarker-based risk score for predicting stroke in atrial fibrillation. *Eur. Heart J.* *37*, 1582–1590.

Hinchee-Rodriguez, K., Garg, N., Venkatakrishnan, P., Roman, M.G., Adamo, M.L., Masters, B.S., and Roman, L.J. (2013). Neuronal nitric oxide synthase is phosphorylated in response to insulin stimulation in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *435*, 501–505.

Hirabayashi, H., Takizawa, S., Fukuyama, N., Nakazawa, H., and Shinohara, Y. (1999). 7-Nitroindazole attenuates nitrotyrosine formation in the early phase of cerebral ischemia-reperfusion in mice. *Neurosci. Lett.* *268*, 111–113.

Hirabayashi, H., Takizawa, S., Fukuyama, N., Nakazawa, H., and Shinohara, Y. (2000). Nitrotyrosine generation via inducible nitric oxide synthase in vascular wall in focal ischemia-reperfusion. *Brain Res.* *852*, 319–325.

Hirst, S., Karakoti, A.S., Tyler, R.D., Sriranganathan, N., Seal, S., and Reilly, C.M. (2009). Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* *5*, 2848–2856.

Hirst, S., Karakoti, A., Tyler, R., Sriranganathan, N., Seal, S., and Reilly, C. (2010). Bio-distribution and in vivo antioxidant properties of cerium oxide nanoparticles (87.26). *J. Immunol.* *184*, 87.26–87.26.

Hirst, S., Karakoti, A., Singh, S., Self, W., Tyler, R., Seal, S., and Reilly, C.M. (2013). Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. *Environ. Toxicol.* *28*, 107–118.

Hoehn, B.D., Palmer, T.D., and Steinberg, G.K. (2005). Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke* *36*, 2718–2724.

Hogan-Cann, A.D., and Anderson, C.M. (2016). Physiological Roles of Non-Neuronal NMDA Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* *37*, 750–767.

- Hong, H., Zeng, J.-S., Kreulen, D.L., Kaufman, D.I., and Chen, A.F. (2006). Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *291*, H2210-2215.
- Hood, J.D., and Cheresch, D.A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 91–100.
- Horie, M., Nishio, K., Kato, H., Fujita, K., Endoh, S., Nakamura, A., Miyauchi, A., Kinugasa, S., Yamamoto, K., Niki, E., et al. (2011). Cellular responses induced by cerium oxide nanoparticles: induction of intracellular calcium level and oxidative stress on culture cells. *J. Biochem. (Tokyo)* *150*, 461–471.
- Hosseini, A., Sharifi, A.M., Abdollahi, M., Najafi, R., Baeeri, M., Rayegan, S., Cheshmehpour, J., Hassani, S., Bayrami, Z., and Safa, M. (2015). Cerium and yttrium oxide nanoparticles against lead-induced oxidative stress and apoptosis in rat hippocampus. *Biol. Trace Elem. Res.* *164*, 80–89.
- Hossmann, K.-A. (2006). Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell. Mol. Neurobiol.* *26*, 1057–1083.
- Houée-Lévin, C., Bobrowski, K., Horakova, L., Karademir, B., Schöneich, C., Davies, M.J., and Spickett, C.M. (2015). Exploring oxidative modifications of tyrosine: an update on mechanisms of formation, advances in analysis and biological consequences. *Free Radic. Res.* *49*, 347–373.
- Huang, C.-W., Tsai, M.-H., Chen, N.-C., Chen, W.-H., Lu, Y.-T., Lui, C.-C., Chang, Y.-T., Chang, W.-N., Chang, A.Y.W., and Chang, C.-C. (2015). Clinical significance of circulating vascular cell adhesion molecule-1 to white matter disintegrity in Alzheimer's dementia. *Thromb. Haemost.* *114*, 1230–1240.
- Huang, J., Agus, D.B., Winfree, C.J., Kiss, S., Mack, W.J., McTaggart, R.A., Choudhri, T.F., Kim, L.J., Mocco, J., Pinsky, D.J., et al. (2001). Dehydroascorbic acid, a blood-brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 11720–11724.
- Huang, L., Wang, J., Huang, S., Siaw-Debrah, F., Nyanzu, M., and Zhuge, Q. (2019). Polyacrylic acid-coated nanoparticles loaded with recombinant tissue plasminogen activator for the treatment of mice with ischemic stroke. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *516*, 565–570.
- Huang, X., MacIsaac, R., Thompson, J.L., Levin, B., Buchsbaum, R., Haley, E.C., Levi, C., Campbell, B., Bladin, C., Parsons, M., et al. (2016). Tenecteplase versus alteplase in stroke thrombolysis: An individual patient data meta-analysis of randomized controlled trials. *Int. J. Stroke Off. J. Int. Stroke Soc.* *11*, 534–543.
- Huang, Z., Shimazu, K., Woo, N.H., Zang, K., Müller, U., Lu, B., and Reichardt, L.F. (2006). Distinct roles of the beta 1-class integrins at the developing and the mature hippocampal excitatory synapse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 11208–11219.
- Huo, Y., Hafezi-Moghadam, A., and Ley, K. (2000). Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* *87*, 153–159.
- Iadecola, C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* *20*, 132–139.

- Iadecola, C., and Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* *17*, 796–808.
- Iadecola, C., Forster, C., Nogawa, S., Clark, H.B., and Ross, M.E. (1999). Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *98*, 9–14.
- Iadecola, C., Sugimoto, K., Niwa, K., Kazama, K., and Ross, M.E. (2001a). Increased susceptibility to ischemic brain injury in cyclooxygenase-1-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *21*, 1436–1441.
- Iadecola, C., Niwa, K., Nogawa, S., Zhao, X., Nagayama, M., Araki, E., Morham, S., and Ross, M.E. (2001b). Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 1294–1299.
- Ichinose, N., Ozaki, Y., and Kashu, S. (2012). *Superfine Particle Technology* (Springer Science & Business Media).
- Imaizumi, S., Woolworth, V., Fishman, R.A., and Chan, P.H. (1990). Liposome-entrapped superoxide dismutase reduces cerebral infarction in cerebral ischemia in rats. *Stroke* *21*, 1312–1317.
- Inatomi, Y., Takita, T., Yonehara, T., Fujioka, S., Hashimoto, Y., Hirano, T., and Uchino, M. (2006). Efficacy of edaravone in cardioembolic stroke. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* *45*, 253–257.
- Irving, E.A., and Bamford, M. (2002). Role of Mitogen- and Stress-Activated Kinases in Ischemic Injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *22*, 631–647.
- IST-3 collaborative group, Sandercock, P., Wardlaw, J.M., Lindley, R.I., Dennis, M., Cohen, G., Murray, G., Innes, K., Venables, G., Czlonkowska, A., et al. (2012). The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* *379*, 2352–2363.
- Jackman, J.A., Cho, D.-J., Lee, J., Chen, J.M., Besenbacher, F., Bonnell, D.A., Hersam, M.C., Weiss, P.S., and Cho, N.-J. (2016). Nanotechnology Education for the Global World: Training the Leaders of Tomorrow. *ACS Nano* *10*, 5595–5599.
- Jackman, K.A., Miller, A.A., Drummond, G.R., and Sobey, C.G. (2009). Importance of NOX1 for angiotensin II-induced cerebrovascular superoxide production and cortical infarct volume following ischemic stroke. *Brain Res.* *1286*, 215–220.
- Jaillard, A., Cornu, C., Durieux, A., Moulin, T., Boutitie, F., Lees, K.R., and Hommel, M. (1999). Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. The MAST-E study. MAST-E Group. *Stroke* *30*, 1326–1332.
- Jang, Y.J., Park, B., Lee, H.-W., Park, H.J., Koo, H.J., Kim, B.O., Sohn, E.-H., Um, S.H., and Pyo, S. (2017). Sinigrin attenuates the progression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice fed a high-cholesterol diet potentially by inhibiting VCAM-1 expression. *Chem. Biol. Interact.* *272*, 28–36.
- Jayko, M.E., and Garrison, W.M. (1958). Formation of >C=O Bonds in the Radiation-induced Oxidation of Protein in Aqueous Systems. *Nature* *181*, 413–414.
- Jiang, F., Zhang, Y., and Dusting, G.J. (2011). NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol. Rev.* *63*, 218–242.

Jiang, X., Chen, J., Bajić, A., Zhang, C., Song, X., Carroll, S.L., Cai, Z.-L., Tang, M., Xue, M., Cheng, N., et al. (2017). Quantitative real-time imaging of glutathione. *Nat. Commun.* *8*, 16087.

Jiao, X., Song, H., Zhao, H., Bai, W., Zhang, L., and Lv, Y. (2012). Well-redispersed ceria nanoparticles: Promising peroxidase mimetics for H₂O₂ and glucose detection. *Anal. Methods* *4*, 3261–3267.

Jones, J.T., Qian, X., van der Velden, J.L.J., Chia, S.B., McMillan, D.H., Flemer, S., Hoffman, S.M., Lahue, K.G., Schneider, R.W., Nolin, J.D., et al. (2016). Glutathione S-transferase pi modulates NF- κ B activation and pro-inflammatory responses in lung epithelial cells. *Redox Biol.* *8*, 375–382.

Jones, T.H., Morawetz, R.B., Crowell, R.M., Marcoux, F.W., FitzGibbon, S.J., DeGirolami, U., and Ojemann, R.G. (1981). Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J. Neurosurg.* *54*, 773–782.

Jovin, T.G., Chamorro, A., Cobo, E., de Miquel, M.A., Molina, C.A., Rovira, A., San Román, L., Serena, J., Abilleira, S., Ribó, M., et al. (2015). Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* *372*, 2296–2306.

Jung, S., Gilgen, M., Slotboom, J., El-Koussy, M., Zubler, C., Kiefer, C., Luedi, R., Mono, M.-L., Heldner, M.R., Weck, A., et al. (2013). Factors that determine penumbral tissue loss in acute ischaemic stroke. *Brain J. Neurol.* *136*, 3554–3560.

Justicia, C., Martín, A., Rojas, S., Gironella, M., Cervera, Á., Panés, J., Chamorro, Á., and Planas, A.M. (2006). Anti-VCAM-1 Antibodies did not Protect against Ischemic Damage Either in Rats Or in Mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *26*, 421–432.

Kabel, A.M. (2014). Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition. *World J. Nutr. Health* *2*, 35–38.

Kaesmacher, J., Kaesmacher, M., Maegerlein, C., Zimmer, C., Gersing, A.S., Wunderlich, S., Friedrich, B., Boeckh-Behrens, T., and Kleine, J.F. (2017). Hemorrhagic Transformations after Thrombectomy: Risk Factors and Clinical Relevance. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* *43*, 294–304.

Kaesmacher, J., Mordasini, P., Arnold, M., López-Cancio, E., Cerdá, N., Boeckh-Behrens, T., Kleine, J.F., Goyal, M., Hill, M.D., Pereira, V.M., et al. (2019). Direct mechanical thrombectomy in tPA-ineligible and -eligible patients versus the bridging approach: a meta-analysis. *J. Neurointerventional Surg.* *11*, 20–27.

Kahles, T., Kohlen, A., Heumueller, S., Rappert, A., Bechmann, I., Liebner, S., Wittko, I.M., Neumann-Haefelin, T., Steinmetz, H., Schroeder, K., et al. (2010). NADPH oxidase Nox1 contributes to ischemic injury in experimental stroke in mice. *Neurobiol. Dis.* *40*, 185–192.

Kamat, P.K., Kalani, A., Tyagi, S.C., and Tyagi, N. (2015). Hydrogen Sulfide Epigenetically Attenuates Homocysteine-Induced Mitochondrial Toxicity Mediated Through NMDA Receptor in Mouse Brain Endothelial (bEnd3) Cells. *J. Cell. Physiol.* *230*, 378–394.

Kanazawa, M., Takahashi, T., Nishizawa, M., and Shimohata, T. (2017). Therapeutic Strategies to Attenuate Hemorrhagic Transformation After Tissue Plasminogen Activator Treatment for Acute Ischemic Stroke. *J. Atheroscler. Thromb.* *24*, 240–253.

Karakoti, A., Singh, S., Dowding, J.M., Seal, S., and Self, W.T. (2010). Redox-active radical scavenging nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* *39*, 4422–4432.

- Karakoti, A.S., Kuchibhatla, S.V.N.T., Babu, K.S., and Seal, S. (2007). Direct Synthesis of Nanoceria in Aqueous Polyhydroxyl Solutions. *J. Phys. Chem. C* *111*, 17232–17240.
- Karaszewski, B., Wardlaw, J.M., Marshall, I., Cvorovic, V., Wartolowska, K., Haga, K., Armitage, P.A., Bastin, M.E., and Dennis, M.S. (2009). Early brain temperature elevation and anaerobic metabolism in human acute ischaemic stroke. *Brain J. Neurol.* *132*, 955–964.
- Karatas, H., Eun Jung, J., Lo, E.H., and van Leyen, K. (2018). Inhibiting 12/15-lipoxygenase to treat acute stroke in permanent and tPA induced thrombolysis models. *Brain Res.* *1678*, 123–128.
- Kargozar, S., and Mozafari, M. (2018). Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. *Mater. Today Proc.* *5*, 15492–15500.
- Karlsson, J., Ungell, A., Gråsjö, J., and Artursson, P. (1999). Paracellular drug transport across intestinal epithelia: influence of charge and induced water flux. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* *9*, 47–56.
- Kato, N., Yanaka, K., Nagase, S., Hirayama, A., and Nose, T. (2003a). The antioxidant EPC-K1 ameliorates brain injury by inhibiting lipid peroxidation in a rat model of transient focal cerebral ischaemia. *Acta Neurochir. (Wien)* *145*, 489–493.
- Kato, N., Yanaka, K., Hyodo, K., Homma, K., Nagase, S., and Nose, T. (2003b). Stable nitroxide Tempol ameliorates brain injury by inhibiting lipid peroxidation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Brain Res.* *979*, 188–193.
- Katsura, K., Kristián, T., and Siesjö, B.K. (1994). Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem. Soc. Trans.* *22*, 991–996.
- Kaufmann Anthony M., Firlik Andrew D., Fukui Melanie B., Wechsler Lawrence R., Jungries Charles A., and Yonas Howard (1999). Ischemic Core and Penumbra in Human Stroke. *Stroke* *30*, 93–99.
- Kaur, J., Zhao, Z., Klein, G.M., Lo, E.H., and Buchan, A.M. (2004). The neurotoxicity of tissue plasminogen activator? *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *24*, 945–963.
- Kaur, K., Salomon, R.G., O’Neil, J., and Hoff, H.F. (1997). (Carboxyalkyl)pyrroles in Human Plasma and Oxidized Low-Density Lipoproteins. *Chem. Res. Toxicol.* *10*, 1387–1396.
- Kawabori, M., and Yenari, M.A. (2015). Inflammatory responses in brain ischemia. *Curr. Med. Chem.* *22*, 1258–1277.
- Kechagia, J.Z., Ivaska, J., and Roca-Cusachs, P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 457–473.
- Kernan, W.N., Viscoli, C.M., Furie, K.L., Young, L.H., Inzucchi, S.E., Gorman, M., Guarino, P.D., Lovejoy, A.M., Peduzzi, P.N., Conwit, R., et al. (2016). Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *N. Engl. J. Med.* *374*, 1321–1331.
- Khan, M., Sekhon, B., Jatana, M., Giri, S., Gilg, A.G., Sekhon, C., Singh, I., and Singh, A.K. (2004). Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J. Neurosci. Res.* *76*, 519–527.

Khan, M.E., Khan, M.M., and Cho, M.H. (2017). Ce 3+ -ion, Surface Oxygen Vacancy, and Visible Light-induced Photocatalytic Dye Degradation and Photocapacitive Performance of CeO₂-Graphene Nanostructures. *Sci. Rep.* 7, 1–17.

Khatri, P., Yeatts, S.D., Mazighi, M., Broderick, J.P., Liebeskind, D.S., Demchuk, A.M., Amarenco, P., Carrozzella, J., Spilker, J., Foster, L.D., et al. (2014). Time to Angiographic Reperfusion and Clinical Outcome after Acute Ischemic Stroke in the Interventional Management of Stroke Phase III (IMS III) Trial: A Validation Study. *Lancet Neurol.* 13, 567–574.

Khlebtsov, N., Bogatyrev, V., Dykman, L., Khlebtsov, B., Staroverov, S., Shirokov, A., Matora, L., Khanadeev, V., Pylaev, T., Tsyganova, N., et al. (2013). Analytical and Theranostic Applications of Gold Nanoparticles and Multifunctional Nanocomposites. *Theranostics* 3, 167–180.

Khoshnam, S.E., Winlow, W., Farzaneh, M., Farbood, Y., and Moghaddam, H.F. (2017). Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 38, 1167–1186.

Khoury, N.N., Darsaut, T.E., Ghostine, J., Deschaintre, Y., Daneault, N., Durocher, A., Lanthier, S., Poppe, A.Y., Odier, C., Lebrun, L.-H., et al. (2017). Endovascular thrombectomy and medical therapy versus medical therapy alone in acute stroke: A randomized care trial. *J. Neuroradiol. J. Neuroradiol.* 44, 198–202.

Kidwell, C.S., Saver, J.L., Carneado, J., Sayre, J., Starkman, S., Duckwiler, G., Gobin, Y.P., Jahan, R., Vespa, P., Villablanca, J.P., et al. (2002). Predictors of hemorrhagic transformation in patients receiving intra-arterial thrombolysis. *Stroke* 33, 717–724.

Kilic, E., Kilic, U., Yulug, B., Hermann, D.M., and Reiter, R.J. (2004). Melatonin reduces disseminate neuronal death after mild focal ischemia in mice via inhibition of caspase-3 and is suitable as an add-on treatment to tissue-plasminogen activator. *J. Pineal Res.* 36, 171–176.

Kilpatrick, K., Novoa, J.A., Hancock, T., Guerriero, C.J., Wipf, P., Brodsky, J.L., and Segatori, L. (2013). Chemical Induction of Hsp70 Reduces α -Synuclein Aggregation in Neuroglioma Cells. *ACS Chem. Biol.* 8, 1460–1468.

Kim, C.K., Kim, T., Choi, I.-Y., Soh, M., Kim, D., Kim, Y.-J., Jang, H., Yang, H.-S., Kim, J.Y., Park, H.-K., et al. (2012). Ceria nanoparticles that can protect against ischemic stroke. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 51, 11039–11043.

Kim, H.-J., Park, K.-G., Yoo, E.-K., Kim, Y.-H., Kim, Y.-N., Kim, H.-S., Kim, H.T., Park, J.-Y., Lee, K.-U., Jang, W.G., et al. (2007). Effects of PGC-1 α on TNF- α -Induced MCP-1 and VCAM-1 Expression and NF- κ B Activation in Human Aortic Smooth Muscle and Endothelial Cells. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 301–307.

Kim, H.-J., Ha, S., Lee, H.Y., and Lee, K.-J. (2015). ROSics: chemistry and proteomics of cysteine modifications in redox biology. *Mass Spectrom. Rev.* 34, 184–208.

Kimelberg, H.K. (2005). Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia* 50, 389–397.

Kinuta, Y., Kikuchi, H., Ishikawa, M., Kimura, M., and Itokawa, Y. (1989). Lipid peroxidation in focal cerebral ischemia. *J. Neurosurg.* 71, 421–429.

- Kiyohara, T., Kamouchi, M., Kumai, Y., Ninomiya, T., Hata, J., Yoshimura, S., Ago, T., Okada, Y., Kitazono, T., and Fukuoka Stroke Registry Investigators (2014). ABCD3 and ABCD3-I scores are superior to ABCD2 score in the prediction of short- and long-term risks of stroke after transient ischemic attack. *Stroke* 45, 418–425.
- Klatt, P., Pfeiffer, S., List, B.M., Lehner, D., Glatter, O., Bächinger, H.P., Werner, E.R., Schmidt, K., and Mayer, B. (1996). Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* 271, 7336–7342.
- Kleinschnitz, C., Grund, H., Wingler, K., Armitage, M.E., Jones, E., Mittal, M., Barit, D., Schwarz, T., Geis, C., Kraft, P., et al. (2010). Post-Stroke Inhibition of Induced NADPH Oxidase Type 4 Prevents Oxidative Stress and Neurodegeneration. *PLOS Biol.* 8, e1000479.
- Klibanov, A.L., Maruyama, K., Torchilin, V.P., and Huang, L. (1990). Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* 268, 235–237.
- Klomsiri, C., Karplus, P.A., and Poole, L.B. (2011). Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 1065–1077.
- Kondo, T., Reaume, A.G., Huang, T.-T., Murakami, K., Carlson, E., Chen, S., Scott, R.W., Epstein, C.J., and Chan, P.H. (1997). Edema Formation Exacerbates Neurological and Histological Outcomes After Focal Cerebral Ischemia in CuZn-Superoxide Dismutase Gene Knockout Mutant Mice. In *Brain Edema X*, H.E. James, L.F. Marshall, H.J. Raulen, A. Baethmann, A. Marmarou, U. Ito, J.T. Hoff, T. Kuroiwa, and Z. Czernicki, eds. (Springer Vienna), pp. 62–64.
- Kong, D.-H., Kim, Y.K., Kim, M.R., Jang, J.H., and Lee, S. (2018). Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Koppenol, W.H. (2001). The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* 6, 229–234.
- Korsvik, C., Patil, S., Seal, S., and Self, W.T. (2007). Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 1056–1058.
- Kostandy, B.B. (2012). The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 33, 223–237.
- Kostić, D.A., Dimitrijević, D.S., Stojanović, G.S., Palić, I.R., Đorđević, A.S., and Ickovski, J.D. (2015). Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition.
- Koumura, A., Nonaka, Y., Hyakkoku, K., Oka, T., Shimazawa, M., Hozumi, I., Inuzuka, T., and Hara, H. (2008). A novel calpain inhibitor, ((1S)-1((((1S)-1-benzyl-3-cyclopropylamino-2,3-dioxopropyl)amino)carbonyl)-3-methylbutyl) carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester, protects neuronal cells from cerebral ischemia-induced damage in mice. *Neuroscience* 157, 309–318.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312–318.
- Kriz, J. (2006). Inflammation in Ischemic Brain Injury: Timing Is Important. *Crit. Rev. Neurobiol.* 18.
- Krizbai, I.A., Deli, M.A., Pestenác, A., Siklós, L., Szabó, C.A., András, I., and Joó, F. (1998). Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J. Neurosci. Res.* 54, 814–819.

- Krnjević, K. (2008). Electrophysiology of cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 55, 319–333.
- Krzyzanowski, M., Apte, J.S., Bonjour, S.P., Brauer, M., Cohen, A.J., and Prüss-Ustun, A.M. (2014). Air Pollution in the Mega-cities. *Curr. Environ. Health Rep.* 1, 185–191.
- Kuchma, M.H., Komanski, C.B., Colon, J., Teblum, A., Masunov, A.E., Alvarado, B., Babu, S., Seal, S., Summy, J., and Baker, C.H. (2010). Phosphate ester hydrolysis of biologically relevant molecules by cerium oxide nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 6, 738–744.
- Kumari, M., Singh, S.P., Chinde, S., Rahman, M.F., Mahboob, M., and Grover, P. (2014). Toxicity study of cerium oxide nanoparticles in human neuroblastoma cells. *Int. J. Toxicol.* 33, 86–97.
- Kuroda, S., Tsuchidate, R., Smith, M.L., Maples, K.R., and Siesjö, B.K. (1999). Neuroprotective effects of a novel nitron, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 778–787.
- Kwon, I.-S., Yim, J.-H., Lee, H.-K., and Pyo, S. (2016). Lobaric Acid Inhibits VCAM-1 Expression in TNF- α -Stimulated Vascular Smooth Muscle Cells via Modulation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Biomol. Ther.* 24, 25–32.
- Lacza, Z., Pankotai, E., and Busija, D.W. (2009). Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 4436–4443.
- Lagarrigue, F., Kim, C., and Ginsberg, M.H. (2016). The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. *Blood* 128, 479–487.
- Lähteenvuo, J., and Rosenzweig, A. (2012). Effects of aging on angiogenesis. *Circ. Res.* 110, 1252–1264.
- Lakhan, S.E., Kirchgessner, A., Tepper, D., and Leonard, A. (2013). Matrix Metalloproteinases and Blood-Brain Barrier Disruption in Acute Ischemic Stroke. *Front. Neurol.* 4.
- Lambertsen, K.L., Biber, K., and Finsen, B. (2012). Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1677–1698.
- Lancelot, E., Callebert, J., Lerouet, D., Revaud, M.L., Boulu, R.G., and Plotkine, M. (1995). Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in the basal hydroxyl radical production in the striatum of awake rats as measured by brain microdialysis. *Neurosci. Lett.* 202, 21–24.
- Laneuville, O., Breuer, D.K., Xu, N., Huang, Z.H., Gage, D.A., Watson, J.T., Lagarde, M., DeWitt, D.L., and Smith, W.L. (1995). Fatty acid substrate specificities of human prostaglandin-endoperoxide H synthase-1 and -2. Formation of 12-hydroxy-(9Z, 13E/Z, 15Z)- octadecatrienoic acids from alpha-linolenic acid. *J. Biol. Chem.* 270, 19330–19336.
- Lansberg, M.G., Thijs, V.N., Bammer, R., Kemp, S., Wijman, C.A.C., Marks, M.P., and Albers, G.W. (2007). Risk Factors of Symptomatic Intracerebral Hemorrhage After tPA Therapy for Acute Stroke. *Stroke J. Cereb. Circ.* 38, 2275–2278.
- Lapchak, P.A. (2010). A critical assessment of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: is edaravone an effective neuroprotective therapy? *Expert Opin. Pharmacother.* 11, 1753–1763.

- Lapchak, P.A., Schubert, D.R., and Maher, P.A. (2011). De-Risking of Stilbazulenyl Nitron (STAZN), a Lipophilic Nitron to Treat Stroke Using a Unique Panel of In Vitro Assays. *Transl. Stroke Res.* 2, 209–217.
- Lee, B., Lee, W.J., and Jung, Y.-S. (2017). Chrysin Attenuates VCAM-1 Expression and Monocyte Adhesion in Lipopolysaccharide-Stimulated Brain Endothelial Cells by Preventing NF- κ B Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1424.
- Lee, H.-S., Namkoong, K., Kim, D.-H., Kim, K.-J., Cheong, Y.-H., Kim, S.-S., Lee, W.-B., and Kim, K.-Y. (2004). Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells. *Microvasc. Res.* 68, 231–238.
- Lee, S., Kim, S.M., and Lee, R.T. (2013a). Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1165–1207.
- Lee, S.S., Song, W., Cho, M., Puppala, H.L., Nguyen, P., Zhu, H., Segatori, L., and Colvin, V.L. (2013b). Antioxidant Properties of Cerium Oxide Nanocrystals as a Function of Nanocrystal Diameter and Surface Coating. *ACS Nano* 7, 9693–9703.
- Lees, K.R. (1999). ECASS-II: intravenous alteplase in acute ischaemic stroke. *The Lancet* 353, 65–66.
- Lees, K.R., Zivin, J.A., Ashwood, T., Davalos, A., Davis, S.M., Diener, H.-C., Grotta, J., Lyden, P., Shuaib, A., Hårdemark, H.-G., et al. (2006). NXY-059 for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 354, 588–600.
- Leinonen, J.S., Ahonen, J.P., Lönnrot, K., Jehkonen, M., Dastidar, P., Molnár, G., and Alho, H. (2000). Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. *Stroke* 31, 33–39.
- Leon, J., Sakumi, K., Castillo, E., Sheng, Z., Oka, S., and Nakabeppu, Y. (2016). 8-Oxoguanine accumulation in mitochondrial DNA causes mitochondrial dysfunction and impairs neurogenesis in cultured adult mouse cortical neurons under oxidative conditions. *Sci. Rep.* 6, 22086.
- Lerouet, D., Beray-Berthet, V., Palmier, B., Plotkine, M., and Margail, I. (2002). Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 958, 166–175.
- Lertkiatmongkol, P., Liao, D., Mei, H., Hu, Y., and Newman, P.J. (2016). Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Curr. Opin. Hematol.* 23, 253–259.
- Leserman, L.D., Barbet, J., Kourilsky, F., and Weinstein, J.N. (1980). Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature* 288, 602–604.
- van Leyen, K., Kim, H.Y., Lee, S.-R., Jin, G., Arai, K., and Lo, E.H. (2006). Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke* 37, 3014–3018.
- Li, W., and Yang, S. (2016). Targeting oxidative stress for the treatment of ischemic stroke: Upstream and downstream therapeutic strategies. *Brain Circ.* 2, 153.
- Li, G., Zou, L., Jack, C.R., Yang, Y., and Yang, E.S. (2007). Neuroprotective effect of Coenzyme Q10 on ischemic hemisphere in aged mice with mutations in the amyloid precursor protein. *Neurobiol. Aging* 28, 877–882.

- Li, H., Wang, Y., Feng, D., Liu, Y., Xu, M., Gao, A., Tian, F., Zhang, L., Cui, Y., Wang, Z., et al. (2014). Alterations in the time course of expression of the Nox family in the brain in a rat experimental cerebral ischemia and reperfusion model: effects of melatonin. *J. Pineal Res.* *57*, 110–119.
- Li, M., Shi, P., Xu, C., Ren, J., and Qu, X. (2013a). Cerium oxide caged metal chelator: anti-aggregation and anti-oxidation integrated H₂O₂-responsive controlled drug release for potential Alzheimer's disease treatment. *Chem. Sci.* *4*, 2536–2542.
- Li, P., Hu, X., Gan, Y., Gao, Y., Liang, W., and Chen, J. (2011). Mechanistic insight into DNA damage and repair in ischemic stroke: exploiting the base excision repair pathway as a model of neuroprotection. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 1905–1918.
- Li, P., Stetler, R.A., Leak, R.K., Shi, Y., Li, Y., Yu, W., Bennett, M.V.L., and Chen, J. (2018). Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to preserve the genome and improve stroke recovery. *Neuropharmacology* *134*, 208–217.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E.T., Wang, H., and Yang, X. (2013b). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J. Hematol. Oncol.* *6*, 19.
- Liang Jia, Qi Zhifeng, Liu Wenlan, Wang Peng, Shi Wenjuan, Dong Wen, Ji Xunming, Luo Yumin, and Liu Ke Jian (2015). Normobaric Hyperoxia Slows Blood–Brain Barrier Damage and Expands the Therapeutic Time Window for Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment in Cerebral Ischemia. *Stroke* *46*, 1344–1351.
- Liesz, A., Zhou, W., Mracskó, É., Karcher, S., Bauer, H., Schwarting, S., Sun, L., Bruder, D., Stegemann, S., Cerwenka, A., et al. (2011). Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain J. Neurol.* *134*, 704–720.
- Lin, H., Lin, T.-N., Cheung, W.-M., Nian, G.-M., Tseng, P.-H., Chen, S.-F., Chen, J.-J., Shyue, S.-K., Liou, J.-Y., Wu, C.-W., et al. (2002). Cyclooxygenase-1 and bicistronic cyclooxygenase-1/prostacyclin synthase gene transfer protect against ischemic cerebral infarction. *Circulation* *105*, 1962–1969.
- Lind, M., Hayes, A., Caprnda, M., Petrovic, D., Rodrigo, L., Kruzliak, P., and Zulli, A. (2017). Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *93*, 370–375.
- Lindley, R.I., Wardlaw, J.M., Sandercock, P.A.G., Rimdusid, P., Lewis, S.C., Signorini, D.F., and Ricci, S. (2004). Frequency and risk factors for spontaneous hemorrhagic transformation of cerebral infarction. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* *13*, 235–246.
- Liu, Y., and Chen, X.J. (2013). Adenine Nucleotide Translocase, Mitochondrial Stress, and Degenerative Cell Death. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2013*.
- Liu, Z., and Chopp, M. (2016). Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog. Neurobiol.* *144*, 103–120.
- Liu, B., Liao, M., Mielke, J.G., Ning, K., Chen, Y., Li, L., El-Hayek, Y.H., Gomez, E., Zukin, R.S., Fehlings, M.G., et al. (2006). Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 5309–5319.

- Liu, C., Duan, Z., Guan, Y., Wu, H., Hu, K., Gao, X., Yuan, F., Jiang, Z., Fan, Y., He, B., et al. (2018a). Increased expression of tight junction protein occludin is associated with the protective effect of mosapride against aspirin-induced gastric injury. *Exp. Ther. Med.* *15*, 1626–1632.
- Liu, H., Wei, X., Kong, L., Liu, X., Cheng, L., Yan, S., Zhang, X., and Chen, L. (2015a). NOD2 is involved in the inflammatory response after cerebral ischemia-reperfusion injury and triggers NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species. *Int. J. Biol. Sci.* *11*, 525–535.
- Liu, H., Li, J., Zhao, F., Wang, H., Qu, Y., and Mu, D. (2015b). Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury. *Rev. Neurosci.* *26*, 105–117.
- Liu, J., Jin, X., Liu, K.J., and Liu, W. (2012). Matrix Metalloproteinase-2-Mediated Occludin Degradation and Caveolin-1-Mediated Claudin-5 Redistribution Contribute to Blood–Brain Barrier Damage in Early Ischemic Stroke Stage. *J. Neurosci.* *32*, 3044–3057.
- Liu, S., Shi, H., Liu, W., Furuichi, T., Timmins, G.S., and Liu, K.J. (2004). Interstitial pO₂ in ischemic penumbra and core are differentially affected following transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *24*, 343–349.
- Liu, T., Clark, R.K., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Barone, F.C., and Feuerstein, G.Z. (1994). Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke* *25*, 1481–1488.
- Liu, Y., Zheng, Y., Karatas, H., Wang, X., Foerch, C., Lo, E.H., and van Leyen, K. (2017a). 12/15-Lipoxygenase Inhibition or Knockout Reduces Warfarin-Associated Hemorrhagic Transformation After Experimental Stroke. *Stroke* *48*, 445–451.
- Liu, Y., Ai, K., Ji, X., Askhatova, D., Du, R., Lu, L., and Shi, J. (2017b). Comprehensive Insights into the Multi-Antioxidative Mechanisms of Melanin Nanoparticles and Their Application to Protect Brain from Injury in Ischemic Stroke. *J. Am. Chem. Soc.* *139*, 856–862.
- Liu, Y., Liu, W.-C., Sun, Y., Shen, X., Wang, X., Shu, H., Pan, R., Liu, C.-F., Liu, W., Liu, K.J., et al. (2017c). Normobaric Hyperoxia Extends Neuro- and Vaso-Protection of N-Acetylcysteine in Transient Focal Ischemia. *Mol. Neurobiol.* *54*, 3418–3427.
- Liu, Z., Tuo, Y.-H., Chen, J.-W., Wang, Q.-Y., Li, S., Li, M.-C., Dai, G., Wang, J.-S., Zhang, Y.-L., Feng, L., et al. (2017d). NADPH oxidase inhibitor regulates microRNAs with improved outcome after mechanical reperfusion. *J. Neurointerventional Surg.* *9*, 702–706.
- Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.-C., Kandaswamy, E., Zhou, T., and Zuo, L. (2018b). Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Front. Physiol.* *9*.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R., Carnethon, M., De Simone, G., Ferguson, T.B., Flegal, K., Ford, E., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., et al. (2009). Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* *119*, e21-181.
- Lo, E.H. (2008). A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat. Med.* *14*, 497–500.
- Lochhead, J.J., McCaffrey, G., Quigley, C.E., Finch, J., DeMarco, K.M., Nametz, N., and Davis, T.P. (2010). Oxidative stress increases blood–brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia–reoxygenation. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *30*, 1625–1636.

Logallo, N., Novotny, V., Assmus, J., Kvistad, C.E., Alteheld, L., Rønning, O.M., Thommessen, B., Amthor, K.-F., Ihle-Hansen, H., Kurz, M., et al. (2017). Tenecteplase versus alteplase for management of acute ischaemic stroke (NOR-TEST): a phase 3, randomised, open-label, blinded endpoint trial. *Lancet Neurol.* *16*, 781–788.

López-Menéndez, C., Gascón, S., Sobrado, M., Vidaurre, O.G., Higuero, A.M., Rodríguez-Peña, Á., Iglesias, T., and Díaz-Guerra, M. (2009). Kidins220/ARMS downregulation by excitotoxic activation of NMDARs reveals its involvement in neuronal survival and death pathways. *J. Cell Sci.* *122*, 3554–3565.

Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S.Y., et al. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond. Engl.* *380*, 2095–2128.

Lu, null, Sui, null, and Lu, null (2000). Superplastic extensibility of nanocrystalline copper at room temperature. *Science* *287*, 1463–1466.

Lu, F., Wu, S.-H., Hung, Y., and Mou, C.-Y. (2009). Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small Weinheim, Bergstr. Ger.* *5*, 1408–1413.

Lubos, E., Loscalzo, J., and Handy, D.E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 1957–1997.

Lucas, S.-M., Rothwell, N.J., and Gibson, R.M. (2006). The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.* *147*, S232–S240.

Luengo-Fernandez, R., Gray, A.M., Bull, L., Welch, S., Cuthbertson, F., and Rothwell, P.M. (2013a). Quality of life after TIA and stroke. *Neurology* *81*, 1588–1595.

Luengo-Fernandez, R., Yiin, G.S.C., Gray, A.M., and Rothwell, P.M. (2013b). Population-based study of acute- and long-term care costs after stroke in patients with AF. *Int. J. Stroke Off. J. Int. Stroke Soc.* *8*, 308–314.

Luengo-Fernandez, R., Paul, N.L.M., Gray, A.M., Pendlebury, S.T., Bull, L.M., Welch, S.J.V., Cuthbertson, F.C., Rothwell, P.M., and Oxford Vascular Study (2013c). Population-based study of disability and institutionalization after transient ischemic attack and stroke: 10-year results of the Oxford Vascular Study. *Stroke* *44*, 2854–2861.

Lyden, P.D. (2008). Thrombolytic therapy for acute stroke--not a moment to lose. *N. Engl. J. Med.* *359*, 1393–1395.

Lyden, P.D. (2019). Thrombolytic Therapy for Acute Ischemic Stroke. *Stroke* *50*, 2597–2603.

Lyden, P.D., Grotta, J.C., Levine, S.R., Marler, J.R., Frankel, M.R., and Brott, T.G. (1997). Intravenous thrombolysis for acute stroke. *Neurology* *49*, 14–20.

Lyman, S.V., and Hurst, J.K. (1995). Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: Implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* *117*, 8867–8868.

Lyman, S.V., Khairutdinov, R.F., and Hurst, J.K. (2003). Hydroxyl radical formation by O-O bond homolysis in peroxyxynitrous acid. *Inorg. Chem.* *42*, 5259–5266.

- Lynch, I., and Dawson, K.A. (2008). Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* 3, 40–47.
- Ma, M.W., Wang, J., Zhang, Q., Wang, R., Dhandapani, K.M., Vadlamudi, R.K., and Brann, D.W. (2017). NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Mol. Neurodegener.* 12, 7.
- Macrez, R., Ortega, M.C., Bardou, I., Mehra, A., Fournier, A., Van der Pol, S.M.A., Haelewyn, B., Maubert, E., Lesept, F., Chevilly, A., et al. (2016). Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain J. Neurol.* 139, 2406–2419.
- Mahagne, M.-H. (2008). Fibrinolysis for acute cerebral infarction in 2008: present status and perspectives. *Sang Thromb. Vaiss.* 20, 527–533.
- Mahipal, S.V.K., Subhashini, J., Reddy, M.C., Reddy, M.M., Anilkumar, K., Roy, K.R., Reddy, G.V., and Reddanna, P. (2007). Effect of 15-lipoxygenase metabolites, 15-(S)-HPETE and 15-(S)-HETE on chronic myelogenous leukemia cell line K-562: reactive oxygen species (ROS) mediate caspase-dependent apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 74, 202–214.
- Maier, C.M., Hsieh, L., Crandall, T., Narasimhan, P., and Chan, P.H. (2006). A new approach for the investigation of reperfusion-related brain injury. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1366–1369.
- Mamontov, E., Egami, T., Brezny, R., Koranne, M., and Tyagi, S. (2000). Lattice Defects and Oxygen Storage Capacity of Nanocrystalline Ceria and Ceria-Zirconia. *J. Phys. Chem. B* 104, 11110–11116.
- Manzoor Ahmad Mir, Raid Saleem Albaradie, and Malik Alhussainawi (2014). *Recent Advances in Stroke Therapeutics* (Nova Science Publishers, Incorporated, 2014).
- Margaill, I., Plotkine, M., and Lerouet, D. (2005). Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 429–443.
- Marsh, E.B., Llinas, R.H., Schneider, A.L.C., Hillis, A.E., Lawrence, E., Dziedzic, P., and Gottesman, R.F. (2016). Predicting Hemorrhagic Transformation of Acute Ischemic Stroke: Prospective Validation of the HeRS Score. *Medicine (Baltimore)* 95, e2430.
- Martin, R.L., Lloyd, H.G., and Cowan, A.I. (1994). The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci.* 17, 251–257.
- Martínez-Revelles, S., Avendaño, M.S., García-Redondo, A.B., Alvarez, Y., Aguado, A., Pérez-Girón, J.V., García-Redondo, L., Esteban, V., Redondo, J.M., Alonso, M.J., et al. (2013). Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 51–65.
- Mastorakos, P., and McGavern, D. (2019). The anatomy and immunology of vasculature in the central nervous system. *Sci. Immunol.* 4.
- Matono, R., Miyano, K., Kiyohara, T., and Sumimoto, H. (2014). Arachidonic acid induces direct interaction of the p67(phox)-Rac complex with the phagocyte oxidase Nox2, leading to superoxide production. *J. Biol. Chem.* 289, 24874–24884.
- Matsumoto, S., Koshiishi, I., Inoguchi, T., Nawata, H., and Utsumi, H. (2003). Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice. *Free Radic. Res.* 37, 767–772.

- Matsuo, Y., Kihara, T., Ikeda, M., Ninomiya, M., Onodera, H., and Kogure, K. (1995). Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *15*, 941–947.
- Matthews, R.T., Yang, L., Browne, S., Baik, M., and Beal, M.F. (1998). Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 8892–8897.
- May, J.M., Qu, Z.-C., Juliao, S., and Cobb, C.E. (2005). Ascorbic acid decreases oxidant stress in endothelial cells caused by the nitroxide tempol. *Free Radic. Res.* *39*, 195–202.
- Mayo, J.N., Beard, R.S., Price, T.O., Chen, C.-H., Erickson, M.A., Ercal, N., Banks, W.A., and Bearden, S.E. (2012). Nitritative stress in cerebral endothelium is mediated by mGluR5 in hyperhomocysteinemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *32*, 825–834.
- Mazzolini, J., Weber, R.J.M., Chen, H.-S., Khan, A., Guggenheim, E., Shaw, R.K., Chipman, J.K., Viant, M.R., and Rappoport, J.Z. (2016). Protein Corona Modulates Uptake and Toxicity of Nanoceria via Clathrin-Mediated Endocytosis. *Biol. Bull.* *231*, 40–60.
- McAteer, M.A., Sibson, N.R., von Zur Muhlen, C., Schneider, J.E., Lowe, A.S., Warrick, N., Channon, K.M., Anthony, D.C., and Choudhury, R.P. (2007). In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide. *Nat. Med.* *13*, 1253–1258.
- McCann, S.K., Dusting, G.J., and Roulston, C.L. (2008). Early increase of Nox4 NADPH oxidase and superoxide generation following endothelin-1-induced stroke in conscious rats. *J. Neurosci. Res.* *86*, 2524–2534.
- McCann, S.K., Dusting, G.J., and Roulston, C.L. (2014). Nox2 Knockout Delays Infarct Progression and Increases Vascular Recovery through Angiogenesis in Mice following Ischaemic Stroke with Reperfusion. *PLOS ONE* *9*, e110602.
- McEver, R.P. (2015). Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc. Res.* *107*, 331–339.
- McEver, R.P., and Zhu, C. (2010). Rolling cell adhesion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *26*, 363–396.
- McHale, J.F., Harari, O.A., Marshall, D., and Haskard, D.O. (1999). TNF- α and IL-1 Sequentially Induce Endothelial ICAM-1 and VCAM-1 Expression in MRL/lpr Lupus-Prone Mice. *J. Immunol.* *163*, 3993–4000.
- Mehta, S.L., Manhas, N., and Raghurir, R. (2007). Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res. Rev.* *54*, 34–66.
- Mehta, S.L., Lin, Y., Chen, W., Yu, F., Cao, L., He, Q., Chan, P.H., and Li, P.A. (2011). Manganese Superoxide Dismutase Deficiency Exacerbates Ischemic Brain Damage Under Hyperglycemic Conditions by Altering Autophagy. *Transl. Stroke Res.* *2*, 42–50.
- Mei, T., Kim, A., Vong, L.B., Marushima, A., Puentes, S., Matsumaru, Y., Matsumura, A., and Nagasaki, Y. (2019). Encapsulation of tissue plasminogen activator in pH-sensitive self-assembled antioxidant nanoparticles for ischemic stroke treatment – Synergistic effect of thrombolysis and antioxidant –. *Biomaterials* *215*, 119209.

Meirhaeghe, A., Cotel, D., Cousin, B., Dumont, M.-P., Marécaux, N., Amouyel, P., and Dallongeville, J. (2018). Sex Differences in Stroke Attack, Incidence, and Mortality Rates in Northern France. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* *27*, 1368–1374.

Meli, R., Nauser, T., Latal, P., and Koppenol, W.H. (2002). Reaction of peroxyxynitrite with carbon dioxide: intermediates and determination of the yield of CO₃^{*}- and NO₂^{*}. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* *7*, 31–36.

Milanlioglu, A., Aslan, M., Ozkol, H., Çilingir, V., Nuri Aydın, M., and Karadas, S. (2016). Serum antioxidant enzymes activities and oxidative stress levels in patients with acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome. *Wien. Klin. Wochenschr.* *128*, 169–174.

Miller, D.M., Buettner, G.R., and Aust, S.D. (1990). Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic. Biol. Med.* *8*, 95–108.

Mishima, K., Tanaka, T., Pu, F., Egashira, N., Iwasaki, K., Hidaka, R., Matsunaga, K., Takata, J., Karube, Y., and Fujiwara, M. (2003). Vitamin E isoforms alpha-tocotrienol and gamma-tocopherol prevent cerebral infarction in mice. *Neurosci. Lett.* *337*, 56–60.

Mistry, E.A., Mistry, A.M., Nakawah, M.O., Chitale, R.V., James, R.F., Volpi, J.J., and Fusco, M.R. (2017). Mechanical Thrombectomy Outcomes With and Without Intravenous Thrombolysis in Stroke Patients: A Meta-Analysis. *Stroke* *48*, 2450–2456.

Miura, S., Ishida-Nakajima, W., Ishida, A., Kawamura, M., Ohmura, A., Oguma, R., Sato, Y., and Takahashi, T. (2009). Ascorbic acid protects the newborn rat brain from hypoxic-ischemia. *Brain Dev.* *31*, 307–317.

Mocco, J., Zaidat, O.O., von Kummer, R., Yoo, A.J., Gupta, R., Lopes, D., Frei, D., Shownkeen, H., Budzik, R., Ajani, Z.A., et al. (2016). Aspiration Thrombectomy After Intravenous Alteplase Versus Intravenous Alteplase Alone. *Stroke* *47*, 2331–2338.

Mohan, K.M., Wolfe, C.D.A., Rudd, A.G., Heuschmann, P.U., Kolominsky-Rabas, P.L., and Grieve, A.P. (2011). Risk and cumulative risk of stroke recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Stroke* *42*, 1489–1494.

Monnier, V.M., and Cerami, A. (1981). Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* *211*, 491–493.

Mons, U., Müezziner, A., Gellert, C., Schöttker, B., Abnet, C.C., Bobak, M., Groot, L. de, Freedman, N.D., Jansen, E., Kee, F., et al. (2015). Impact of smoking and smoking cessation on cardiovascular events and mortality among older adults: meta-analysis of individual participant data from prospective cohort studies of the CHANCES consortium. *BMJ* *350*, h1551.

Montaner, J., Alvarez-Sabín, J., Molina, C., Anglés, A., Abilleira, S., Arenillas, J., González, M.A., and Monasterio, J. (2001). Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* *32*, 1759–1766.

Montaner, J., Molina, C.A., Monasterio, J., Abilleira, S., Arenillas, J.F., Ribó, M., Quintana, M., and Alvarez-Sabín, J. (2003). Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* *107*, 598–603.

Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* *354*, 31–37.

- Mosbacher, J., Schoepfer, R., Monyer, H., Burnashev, N., Seeburg, P.H., and Ruppersberg, J.P. (1994). A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science* 266, 1059–1062.
- Moskowitz, M.A., Lo, E.H., and Iadecola, C. (2010). The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67, 181–198.
- Moussaddy, A., Demchuk, A.M., and Hill, M.D. (2018). Thrombolytic therapies for ischemic stroke: Triumphs and future challenges. *Neuropharmacology* 134, 272–279.
- Moustafa, R.R., and Baron, J.-C. (2008). Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 1, S44-54.
- Mrak, R.E., and Griffin, W.S.T. (2005). Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* 26, 349–354.
- Muir, K.W., Ford, G.A., Messow, C.-M., Ford, I., Murray, A., Clifton, A., Brown, M.M., Madigan, J., Lenthal, R., Robertson, F., et al. (2017). Endovascular therapy for acute ischaemic stroke: the Pragmatic Ischaemic Stroke Thrombectomy Evaluation (PISTE) randomised, controlled trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 88, 38–44.
- Mukhopadhyay, S. (2019). Chapter 18 - Nano Drugs: A Critical Review of Their Patents and Market. In *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, S.S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R.K. Mishra, and S. Thomas, eds. (Elsevier), pp. 523–551.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.
- Murphy, T.H., Li, P., Betts, K., and Liu, R. (2008). Two-Photon Imaging of Stroke Onset In Vivo Reveals That NMDA-Receptor Independent Ischemic Depolarization Is the Major Cause of Rapid Reversible Damage to Dendrites and Spines. *J. Neurosci.* 28, 1756–1772.
- Murray, C.J.L., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A.D., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J.A., Abdalla, S., et al. (2012). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond. Engl.* 380, 2197–2223.
- Murugan, K., Choonara, Y.E., Kumar, P., Bijukumar, D., du Toit, L.C., and Pillay, V. (2015). Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures. *Int. J. Nanomedicine* 10, 2191–2206.
- Myriam Ricaud, and Olivier Witschger (2012). *Les nanomatériaux*, INRS, Institut National de Recherche et de Sécurité.
- Nagel, S., Genius, J., Heiland, S., Horstmann, S., Gardner, H., and Wagner, S. (2007). Diphenyleneiodonium and dimethylsulfoxide for treatment of reperfusion injury in cerebral ischemia of the rat. *Brain Res.* 1132, 210–217.
- Naito, S., Nishimura, M., and Tamao, Y. (2000). Evaluation of the pharmacological actions and pharmacokinetics of BOF-4272, a xanthine oxidase inhibitor, in mouse liver. *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 173–179.
- Nakamura, T., Tu, S., Akhtar, M.W., Sunico, C.R., Okamoto, S., and Lipton, S.A. (2013). Aberrant Protein S-Nitrosylation in Neurodegenerative Diseases. *Neuron* 78, 596–614.

Nakase, T., Yoshioka, S., and Suzuki, A. (2011). Free radical scavenger, edaravone, reduces the lesion size of lacunar infarction in human brain ischemic stroke. *BMC Neurol.* *11*, 39.

Naz, S., Beach, J., Heckert, B., Tummala, T., Pashchenko, O., Banerjee, T., and Santra, S. (2017). Cerium oxide nanoparticles: a “radical” approach to neurodegenerative disease treatment. *Nanomed.* *12*, 545–553.

Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M.V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., and Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat. Mater.* *8*, 543–557.

Nelson, B.C., Johnson, M.E., Walker, M.L., Riley, K.R., and Sims, C.M. (2016). Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine. *Antioxid. Basel Switz.* *5*.

Netto, L.E.S., and Antunes, F. (2016). The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol. Cells* *39*, 65–71.

Neuhaus, W., Freidl, M., Szkokan, P., Berger, M., Wirth, M., Winkler, J., Gabor, F., Pifl, C., and Noe, C.R. (2011). Effects of NMDA receptor modulators on a blood-brain barrier in vitro model. *Brain Res.* *1394*, 49–61.

das Neves, J., Rocha, C.M.R., Gonçalves, M.P., Carrier, R.L., Amiji, M., Bahia, M.F., and Sarmiento, B. (2012). Interactions of Microbicide Nanoparticles with a Simulated Vaginal Fluid. *Mol. Pharm.* *9*, 3347–3356.

Ng, C.F., Schafer, F.Q., Buettner, G.R., and Rodgers, V.G.J. (2007). The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. *Free Radic. Res.* *41*, 1201–1211.

Niatsetskaya, Z.V., Sosunov, S.A., Matsiukevich, D., Utkina-Sosunova, I.V., Ratner, V.I., Starkov, A.A., and Ten, V.S. (2012). The Oxygen Free Radicals Originating from Mitochondrial Complex I Contribute to Oxidative Brain Injury Following Hypoxia–Ischemia in Neonatal Mice. *J. Neurosci.* *32*, 3235–3244.

Nicholls, D.G. (2008). Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1147*, 53–60.

Nichols, J.W., and Bae, Y.H. (2014). EPR: Evidence and fallacy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *190*, 451–464.

Nichols, G., Byard, S., Bloxham, M.J., Botterill, J., Dawson, N.J., Dennis, A., Diart, V., North, N.C., and Sherwood, J.D. (2002). A review of the terms agglomerate and aggregate with a recommendation for nomenclature used in powder and particle characterization. *J. Pharm. Sci.* *91*, 2103–2109.

Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margail, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D., and Buisson, A. (2001). The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* *7*, 59–64.

Niki, E. (2014). Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1840*, 809–817.

Niki, E. (2016). Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Arch. Biochem. Biophys.* *595*, 19–24.

- Nikolai Nikolaevich Semenov (1959). *Some Problems in Chemical Kinetics and Reactivity*, Volume 2.
- Nilupul Perera, M., Ma, H.K., Arakawa, S., Howells, D.W., Markus, R., Rowe, C.C., and Donnan, G.A. (2006). Inflammation following stroke. *J. Clin. Neurosci.* *13*, 1–8.
- Nimse, S.B., and Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* *5*, 27986–28006.
- NINDS (1995). Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* *333*, 1581–1588.
- Niu, J., Azfer, A., Rogers, L.M., Wang, X., and Kolattukudy, P.E. (2007). Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* *73*, 549–559.
- Niu, J., Wang, K., and Kolattukudy, P.E. (2011). Cerium oxide nanoparticles inhibit oxidative stress and nuclear factor- κ B activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *338*, 53–61.
- Nogawa, S., Zhang, F., Ross, M.E., and Iadecola, C. (1997). Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 2746–2755.
- Nogueira, R.G., Jadhav, A.P., Haussen, D.C., Bonafe, A., Budzik, R.F., Bhuvu, P., Yavagal, D.R., Ribo, M., Cognard, C., Hanel, R.A., et al. (2018). Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N. Engl. J. Med.* *378*, 11–21.
- Noichri, Y., Palais, G., Ruby, V., D’Autreaux, B., Delaunay-Moisan, A., Nyström, T., Molin, M., and Toledano, M.B. (2015). In vivo parameters influencing 2-Cys Prx oligomerization: The role of enzyme sulfinylation. *Redox Biol.* *6*, 326–333.
- Norrving, B. (2019). Stroke management — recent advances and residual challenges. *Nat. Rev. Neurol.* *15*, 69–71.
- Nuriel, T., Hansler, A., and Gross, S.S. (2011). Protein nitrotryptophan: formation, significance and identification. *J. Proteomics* *74*, 2300–2312.
- O’Collins, V.E., Macleod, M.R., Donnan, G.A., Horky, L.L., van der Worp, B.H., and Howells, D.W. (2006). 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann. Neurol.* *59*, 467–477.
- O’Collins, V.E., Donnan, G.A., Macleod, M.R., and Howells, D.W. (2009). Scope of preclinical testing versus quality control within experiments. *Stroke* *40*, e497.
- O’Donnell, M.J., Chin, S.L., Rangarajan, S., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Rao-Melacini, P., Zhang, X., Pais, P., Agapay, S., et al. (2016). Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *Lancet Lond. Engl.* *388*, 761–775.
- Offner, H., Subramanian, S., Parker, S.M., Afentoulis, M.E., Vandenbark, A.A., and Hurn, P.D. (2006). Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *26*, 654–665.

- Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., Katsura, K.-I., Katayama, Y., Asoh, S., and Ohta, S. (2007). Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* *13*, 688–694.
- Okada, Y., Copeland, B.R., Mori, E., Tung, M.M., Thomas, W.S., and del Zoppo, G.J. (1994). P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* *25*, 202–211.
- Okamoto, K., Eger, B.T., Nishino, T., Kondo, S., Pai, E.F., and Nishino, T. (2003). An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase. Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition. *J. Biol. Chem.* *278*, 1848–1855.
- Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* *59*, 1203–1211.
- Ostrowski, R.P., Colohan, A.R., and Zhang, J.H. (2006). Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Res.* *28*, 399–414.
- Oudemans-van Straaten, H.M., Spoelstra-de Man, A.M., and de Waard, M.C. (2014). Vitamin C revisited. *Crit. Care Lond. Engl.* *18*, 460.
- Ould-Moussa, N., Safi, M., Guedeau-Boudeville, M.A., Montero, D., Conjeaud, H., and Berret, J.-F. (2013). In vitro toxicity of nanocerium: effect of coating and stability in biofluids.
- Ouyang, Y.-B., Voloboueva, L.A., Xu, L.-J., and Giffard, R.G. (2007). Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 4253–4260.
- Pace, N.J., and Weerapana, E. (2014). Zinc-binding cysteines: diverse functions and structural motifs. *Biomolecules* *4*, 419–434.
- Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* *87*, 315–424.
- Paciaroni, M., Balucani, C., Agnelli, G., Caso, V., Silvestrelli, G., Grotta, J.C., Demchuk, A.M., Sohn, S.-I., Orlandi, G., Leys, D., et al. (2012a). Systemic thrombolysis in patients with acute ischemic stroke and Internal Carotid ARtery Occlusion: the ICARO study. *Stroke* *43*, 125–130.
- Paciaroni, M., Agnelli, G., Caso, V., Pieroni, A., Bovi, P., Cappellari, M., Zini, A., Nichelli, P., Inzitari, D., Nesi, M., et al. (2012b). Intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke associated to extracranial internal carotid artery occlusion: the ICARO-2 study. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* *34*, 430–435.
- Packer, L., Witt, E.H., and Tritschler, H.J. (1995). alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* *19*, 227–250.
- Pagliari, F., Mandoli, C., Forte, G., Magnani, E., Pagliari, S., Nardone, G., Licocchia, S., Minieri, M., Di Nardo, P., and Traversa, E. (2012). Cerium oxide nanoparticles protect cardiac progenitor cells from oxidative stress. *ACS Nano* *6*, 3767–3775.
- Pandian, J.D. (2009). Re-canalization in acute ischemic stroke: the strategies. *Neurol. India* *57*, 20–27.

- Panigrahi, M., Sadguna, Y., Shivakumar, B.R., Kolluri, S.V., Roy, S., Packer, L., and Ravindranath, V. (1996). alpha-Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* *717*, 184–188.
- Parfenova, H., Basuroy, S., Bhattacharya, S., Tcheranova, D., Qu, Y., Regan, R.F., and Leffler, C.W. (2006). Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *290*, C1399-1410.
- Park, C.K., Nehls, D.G., Teasdale, G.M., and McCulloch, J. (1989). Effect of the NMDA antagonist MK-801 on local cerebral blood flow in focal cerebral ischaemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *9*, 617–622.
- Park, E.-J., Choi, J., Park, Y.-K., and Park, K. (2008). Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology* *245*, 90–100.
- Park, K., Park, J., Lee, H., Choi, J., Yu, W.-J., and Lee, J. (2018). Toxicity and tissue distribution of cerium oxide nanoparticles in rats by two different routes: single intravenous injection and single oral administration. *Arch. Pharm. Res.* *41*, 1108–1116.
- Park, S.L., Kim, Y.-M., Ahn, J.-H., Lee, S.H., Baik, E.J., Moon, C.-H., and Jung, Y.-S. (2009). Cadmium stimulates the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and JNK activation in cerebrovascular endothelial cells. *J. Pharmacol. Sci.* *110*, 405–409.
- Parke, D.V., and Sapota, A. (1996). Chemical toxicity and reactive oxygen species. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* *9*, 331–340.
- Parks, D.A., and Granger, D.N. (1986). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* *548*, 87–99.
- Parmentier-Batteur, S., Bohme, G.A., Lerouet, D., Zhou-Ding, L., Beray, V., Margail, I., and Plotkine, M. (2001). Antisense Oligodeoxynucleotide to Inducible Nitric Oxide Synthase Protects against Transient Focal Cerebral Ischemia—Induced Brain Injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *21*, 15–21.
- Patil, S., Sandberg, A., Heckert, E., Self, W., and Seal, S. (2007). Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* *28*, 4600–4607.
- Patrick Couvreur (2010). Les nanomédicaments : une approche intelligente pour le traitement des maladies sévères | Mediachimie.
- Paul, B.D., and Snyder, S.H. (2015). H₂S: a novel gasotransmitter that signals by sulfhydration. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 687–700.
- Pauwels, P.J., Opperdoes, F.R., and Trouet, A. (1985). Effects of antimycin, glucose deprivation, and serum on cultures of neurons, astrocytes, and neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* *44*, 143–148.
- Pei, Z., Pang, S.F., and Cheung, R.T.F. (2002). Pretreatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J. Pineal Res.* *32*, 168–172.
- Pelaz, B., Alexiou, C., Alvarez-Puebla, R.A., Alves, F., Andrews, A.M., Ashraf, S., Balogh, L.P., Ballerini, L., Bestetti, A., Brendel, C., et al. (2017). Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano* *11*, 2313–2381.

- Peng, L., He, X., Zhang, P., Zhang, J., Li, Y., Zhang, J., Ma, Y., Ding, Y., Wu, Z., Chai, Z., et al. (2014a). Comparative Pulmonary Toxicity of Two Ceria Nanoparticles with the Same Primary Size. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 6072–6085.
- Peng, P.L., Zhong, X., Tu, W., Soundarapandian, M.M., Molner, P., Zhu, D., Lau, L., Liu, S., Liu, F., and Lu, Y. (2006). ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron* *49*, 719–733.
- Peng, X., Peng, L., Wu, C., and Xie, Y. (2014). Two dimensional nanomaterials for flexible supercapacitors. *Chem. Soc. Rev.* *43*, 3303–3323.
- Perez, J.M., Asati, A., Nath, S., and Kaittanis, C. (2008). Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* *4*, 552–556.
- Pérez-Juste, J., Pastoriza-Santos, I., Liz-Marzán, L.M., and Mulvaney, P. (2005). Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. *Coord. Chem. Rev.* *249*, 1870–1901.
- Perrin, D., and Koppenol, W.H. (2000). The Quantitative Oxidation of Methionine to Methionine Sulfoxide by Peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* *377*, 266–272.
- Persky, R.W., Turtzo, L.C., and McCullough, L.D. (2010). Stroke in women: disparities and outcomes. *Curr. Cardiol. Rep.* *12*, 6–13.
- Peters, O., Back, T., Lindauer, U., Busch, C., Megow, D., Dreier, J., and Dirnagl, U. (1998). Increased Formation of Reactive Oxygen Species after Permanent and Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *18*, 196–205.
- Peters, S.A.E., Huxley, R.R., and Woodward, M. (2014). Diabetes as a risk factor for stroke in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of 64 cohorts, including 775,385 individuals and 12,539 strokes. *Lancet Lond. Engl.* *383*, 1973–1980.
- Petry, A., Weitnauer, M., and Görlach, A. (2010). Receptor activation of NADPH oxidases. *Antioxid. Redox Signal.* *13*, 467–487.
- Piazza, M., Guillemette, J.G., and Dieckmann, T. (2015). Dynamics of nitric oxide synthase-calmodulin interactions at physiological calcium concentrations. *Biochemistry* *54*, 1989–2000.
- Pinoit, J.M., Bejot, Y., Rouaud, O., Benatru, I., Osseby, G.V., Bonin, B., Gisselmann, A., and Giroud, M. (2006). [Post-stroke depression, another handicap]. *Presse Medicale Paris Fr.* *135*, 1789–1793.
- Pirmohamed, T., Dowding, J.M., Singh, S., Wasserman, B., Heckert, E., Karakoti, A.S., King, J.E.S., Seal, S., and Self, W.T. (2010). Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem. Commun. Camb. Engl.* *46*, 2736–2738.
- Pizzi, M., Fallacara, C., Arrighi, V., Memo, M., and Spano, P.F. (1993). Attenuation of excitatory amino acid toxicity by metabotropic glutamate receptor agonists and aniracetam in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* *61*, 683–689.
- Polidori, M.C., Frei, B., Cherubini, A., Nelles, G., Rordorf, G., Keaney, J.F., Schwamm, L., Mecocci, P., Koroshetz, W.J., and Beal, M.F. (1998). Increased plasma levels of lipid hydroperoxides in patients with ischemic stroke. *Free Radic. Biol. Med.* *25*, 561–567.

- Poon, M.T.C., Fonville, A.F., and Al-Shahi Salman, R. (2014). Long-term prognosis after intracerebral haemorrhage: systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 85, 660–667.
- Portioli, C., Benati, D., Pii, Y., Bernardi, P., Crucianelli, M., Santucci, S., Bentivoglio, M., and Passacantando, M. (2013). Short-Term Biodistribution of Cerium Oxide Nanoparticles in Mice: Focus on Brain Parenchyma. *Nanosci. Nanotechnol. Lett.* 5, 1174.
- Poulsen, H.E., Specht, E., Broedbaek, K., Henriksen, T., Ellervik, C., Mandrup-Poulsen, T., Tonnesen, M., Nielsen, P.E., Andersen, H.U., and Weimann, A. (2012). RNA modifications by oxidation: a novel disease mechanism? *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1353–1361.
- de Pourville, G. (2016). Coût de la prise en charge des accidents vasculaires cérébraux en France. *Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl.* 8, 161–168.
- Powers William J., Rabinstein Alejandro A., Ackerson Teri, Adeoye Opeolu M., Bambakidis Nicholas C., Becker Kyra, Biller José, Brown Michael, Demaerschalk Bart M., Hoh Brian, et al. (2018). 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 49, e46–e99.
- Prijic, S., Scancar, J., Romih, R., Cemazar, M., Bregar, V.B., Znidarsic, A., and Sersa, G. (2010). Increased cellular uptake of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles into malignant cells by an external magnetic field. *J. Membr. Biol.* 236, 167–179.
- Pryor, W.A., and Squadrito, G.L. (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* 268, L699–722.
- Putri, R.M., Allende-Ballester, C., Luque, D., Klem, R., Rousou, K.-A., Liu, A., Traulsen, C.H.-H., Rurup, W.F., Koay, M.S.T., Castón, J.R., et al. (2017). Structural Characterization of Native and Modified Encapsulins as Nanoplatforms for in Vitro Catalysis and Cellular Uptake. *ACS Nano* 11, 12796–12804.
- Qiu, Y., Rojas, E., Murray, R.A., Irigoyen, J., Gregurec, D., Castro-Hartmann, P., Fledderman, J., Estrela-Lopis, I., Donath, E., and Moya, S.E. (2015). Cell uptake, intracellular distribution, fate and reactive oxygen species generation of polymer brush engineered CeO(2-x) NPs. *Nanoscale* 7, 6588–6598.
- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., and Freeman, B.A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266, 22028–22034.
- Rådmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., and Samuelsson, B. (2007). 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem. Sci.* 32, 332–341.
- Rådmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., and Samuelsson, B. (2015). 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 331–339.
- Rafiee, L., Hajhashemi, V., and Javanmard, S.H. (2016). Maprotiline inhibits LPS-induced expression of adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) in human endothelial cells. *Res. Pharm. Sci.* 11, 138–144.
- Ragelle, H., Danhier, F., Pr at, V., Langer, R., and Anderson, D.G. (2017). Nanoparticle-based drug delivery systems: a commercial and regulatory outlook as the field matures. *Expert Opin. Drug Deliv.* 14, 851–864.
- Rama, R., and García, J.C. (2016). Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Stroke. *Ischemic Stroke - Updat.*

- Raman, G., Moorthy, D., Hadar, N., Dahabreh, I.J., O'Donnell, T.F., Thaler, D.E., Feldmann, E., Lau, J., and Kitsios, G.D. (2013). Management strategies for asymptomatic carotid stenosis: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* *158*, 676–685.
- Ramos, T.N., Bullard, D.C., and Barnum, S.R. (2014). ICAM-1: Isoforms and Phenotypes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 4469–4474.
- Ranjbar, A., Soleimani Asl, S., Firozian, F., Heidary Dartoti, H., Seyedabadi, S., Taheri Azandariani, M., and Ganji, M. (2018). Role of Cerium Oxide Nanoparticles in a Paraquat-Induced Model of Oxidative Stress: Emergence of Neuroprotective Results in the Brain. *J. Mol. Neurosci. MN* *66*, 420–427.
- Rayner, B.S., Love, D.T., and Hawkins, C.L. (2014). Comparative reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants with mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* *71*, 240–255.
- Reddy, M.K., and Labhasetwar, V. (2009). Nanoparticle-mediated delivery of superoxide dismutase to the brain: an effective strategy to reduce ischemia-reperfusion injury. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *23*, 1384–1395.
- Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A.I., Le, A.D., Shi, S., Shao, C., et al. (2010). Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for Immunosuppression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 2321–2328.
- Ren, J., Sietsma, D., Qiu, S., Moessler, H., and Finklestein, S.P. (2007). Cerebrolysin enhances functional recovery following focal cerebral infarction in rats. *Restor. Neurol. Neurosci.* *25*, 25–31.
- Renu, G., Rani, V.V.D., Nair, S.V., Subramanian, K.R.V., and Lakshmanan, V.-K. (2012). Development of Cerium Oxide Nanoparticles and Its Cytotoxicity in Prostate Cancer Cells.
- Reuter, B., Rodemer, C., Grudzenski, S., Meairs, S., Bugert, P., Hennerici, M.G., and Fatar, M. (2015). Effect of simvastatin on MMPs and TIMPs in human brain endothelial cells and experimental stroke. *Transl. Stroke Res.* *6*, 156–159.
- Reznick, A.Z., and Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* *233*, 357–363.
- Rezvani, Z., Venugopal, J.R., Urbanska, A.M., Mills, D.K., Ramakrishna, S., and Mozafari, M. (2016). A bird's eye view on the use of electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering: Current state-of-the-art, emerging directions and future trends. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *12*, 2181–2200.
- Rhee, S.G. (2016). Overview on Peroxiredoxin. *Mol. Cells* *39*, 1–5.
- Rhee, S.G., and Kil, I.S. (2017). Multiple Functions and Regulation of Mammalian Peroxiredoxins. *Annu. Rev. Biochem.* *86*, 749–775.
- Rhee, S.G., Woo, H.A., and Kang, D. (2017). The Role of Peroxiredoxins in the Transduction of H₂O₂ Signals. *Antioxid. Redox Signal.* *28*, 537–557.
- Rice, M.E. (2011). H₂O₂: A Dynamic Neuromodulator. *The Neuroscientist* *17*, 389–406.
- Rice, G.E., and Bevilacqua, M.P. (1989). An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* *246*, 1303–1306.

- Richard, S., Lagerstedt, L., Burkhard, P.R., Debouverie, M., Turck, N., and Sanchez, J.-C. (2015). E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 as biomarkers of 3-month outcome in cerebrovascular diseases. *J. Inflamm. Lond. Engl.* *12*.
- Robertson, R.P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem.* *279*, 42351–42354.
- Rochette, L., Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M., Cottin, Y., and Vergely, C. (2013). Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Mol. Nutr. Food Res.* *57*, 114–125.
- Rochette, L., Ghibu, S., Muresan, A., and Vergely, C. (2015). Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *93*, 1021–1027.
- Rojas, S., Gispert, J.D., Abad, S., Buaki-Sogo, M., Victor, V.M., Garcia, H., and Herance, J.R. (2012). In Vivo Biodistribution of Amino-Functionalized Ceria Nanoparticles in Rats Using Positron Emission Tomography. *Mol. Pharm.* *9*, 3543–3550.
- Rosell, A., Cuadrado, E., Ortega-Aznar, A., Hernández-Guillamon, M., Lo, E.H., and Montaner, J. (2008). MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* *39*, 1121–1126.
- Rosen, G.M., Tsai, P., and Pou, S. (2002). Mechanism of free-radical generation by nitric oxide synthase. *Chem. Rev.* *102*, 1191–1200.
- Rossi, F., and Zatti, M. (1964). Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* *20*, 21–23.
- Rothwell, P.M., Giles, M.F., Chandratheva, A., Marquardt, L., Geraghty, O., Redgrave, J.N., Lovelock, C.E., Binney, L.E., Bull, L.M., Cuthbertson, F.C., et al. (2007). Effect of urgent treatment of transient ischaemic attack and minor stroke on early recurrent stroke (EXPRESS study): a prospective population-based sequential comparison. *The Lancet* *370*, 1432–1442.
- Rubiera, M., Alvarez-Sabín, J., Ribo, M., Montaner, J., Santamarina, E., Arenillas, J.F., Huertas, R., Delgado, P., Purroy, F., and Molina, C.A. (2005). Predictors of early arterial reocclusion after tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute ischemic stroke. *Stroke* *36*, 1452–1456.
- Sacco, R.L., Kasner, S.E., Broderick, J.P., Caplan, L.R., Connors, J.J.B., Culebras, A., Elkind, M.S.V., George, M.G., Hamdan, A.D., Higashida, R.T., et al. (2013). An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* *44*, 2064–2089.
- Saccoccia, F., Angelucci, F., Boumis, G., Carotti, D., Desiato, G., Miele, A.E., and Bellelli, A. (2014). Thioredoxin reductase and its inhibitors. *Curr. Protein Pept. Sci.* *15*, 621–646.
- Saeed, S.A., Shad, K.F., Saleem, T., Javed, F., and Khan, M.U. (2007). Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke. *Exp. Brain Res.* *182*, 1–10.
- Safi, M., Sarrouj, H., Sandre, O., Mignet, N., and Berret, J.-F. (2010). Interactions between sub-10-nm iron and cerium oxide nanoparticles and 3T3 fibroblasts: the role of the coating and aggregation state. *Nanotechnology* *21*, 145103.

Sagara, H., Matsuda, H., Wada, N., Yagita, H., Fukuda, T., Okumura, K., Makino, S., and Ra, C. (1997). A monoclonal antibody against very late activation antigen-4 inhibits eosinophil accumulation and late asthmatic response in a guinea pig model of asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *112*, 287–294.

Sainz, V., Connot, J., Matos, A.I., Peres, C., Zupancic, E., Moura, L., Silva, L.C., Florindo, H.F., and Gaspar, R.S. (2015). Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *468*, 504–510.

Saladino, J., Liu, M., Live, D., and Sharp, J.S. (2009). Aliphatic peptidyl hydroperoxides as a source of secondary oxidation in hydroxyl radical protein footprinting. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* *20*, 1123–1126.

Salatin, S., Maleki Dizaj, S., and Yari Khosroushahi, A. (2015). Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. *Cell Biol. Int.* *39*, 881–890.

Salvemini, D., Riley, D.P., and Cuzzocrea, S. (2002). SOD mimetics are coming of age. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 367–374.

Sanchis-Gomar, F., García-Giménez, J.L., Gómez-Cabrera, M.C., and Pallardó, F.V. (2014). Mitochondrial biogenesis in health and disease. Molecular and therapeutic approaches. *Curr. Pharm. Des.* *20*, 5619–5633.

Saver, J.L. (2006). Time is brain--quantified. *Stroke* *37*, 263–266.

Saver, J.L., Jahan, R., Levy, E.I., Jovin, T.G., Baxter, B., Nogueira, R.G., Clark, W., Budzik, R., Zaidat, O.O., and SWIFT Trialists (2012). Solitaire flow restoration device versus the Merci Retriever in patients with acute ischaemic stroke (SWIFT): a randomised, parallel-group, non-inferiority trial. *Lancet Lond. Engl.* *380*, 1241–1249.

Saver, J.L., Goyal, M., Bonafe, A., Diener, H.-C., Levy, E.I., Pereira, V.M., Albers, G.W., Cognard, C., Cohen, D.J., Hacke, W., et al. (2015). Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N. Engl. J. Med.* *372*, 2285–2295.

Saver Jeffrey L. (2007). Clinical Impact of NXY-059 Demonstrated in the SAINT I Trial. *Stroke* *38*, 1515–1518.

Sawa, Y., Ueki, T., Hata, M., Iwasawa, K., Tsuruga, E., Kojima, H., Ishikawa, H., and Yoshida, S. (2008). LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human lymphatic endothelium. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *56*, 97–109.

Schauer, E., Wronski, R., Patockova, J., Moessler, H., Doppler, E., Hutter-Paier, B., and Windisch, M. (2006). Neuroprotection of cerebrolysin in tissue culture models of brain ischemia: post lesion application indicates a wide therapeutic window. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* *113*, 855–868.

Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol. CB* *24*, R453-462.

Schlesinger, M., and Bendas, G. (2015). Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)--an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *Int. J. Cancer* *136*, 2504–2514.

Schubert, D., Dargusch, R., Raitano, J., and Chan, S.-W. (2006). Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *342*, 86–91.

- Schwab, J.M., Beschoner, R., Meyermann, R., Gözalan, F., and Schluesener, H.J. (2002). Persistent accumulation of cyclooxygenase-1-expressing microglial cells and macrophages and transient upregulation by endothelium in human brain injury. *J. Neurosurg.* *96*, 892–899.
- Scibior, D., and Czczot, H. (2006). [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Hig. Med. Doswiadczalnej Online* *60*, 170–180.
- Scott, G.S., Bowman, S.R., Smith, T., Flower, R.J., and Bolton, C. (2007). Glutamate-stimulated peroxynitrite production in a brain-derived endothelial cell line is dependent on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation. *Biochem. Pharmacol.* *73*, 228–236.
- Seal, J.B., and Gewertz, B.L. (2005). Vascular Dysfunction in Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann. Vasc. Surg.* *19*, 572–584.
- Seet, R.C.S., and Rabinstein, A.A. (2012). Symptomatic intracranial hemorrhage following intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke: a critical review of case definitions. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* *34*, 106–114.
- Selvaraj, V., Nepal, N., Rogers, S., Manne, N.D.P.K., Arvapalli, R., Rice, K.M., Asano, S., Fankhanel, E., Ma, J.J., Shokuhfar, T., et al. (2015). Inhibition of MAP kinase/NF- κ B mediated signaling and attenuation of lipopolysaccharide induced severe sepsis by cerium oxide nanoparticles. *Biomaterials* *59*, 160–171.
- Sena, E., Wheble, P., Sandercock, P., and Macleod, M. (2007a). Systematic review and meta-analysis of the efficacy of tirilazad in experimental stroke. *Stroke* *38*, 388–394.
- Sena, E., van der Worp, H.B., Howells, D., and Macleod, M. (2007b). How can we improve the pre-clinical development of drugs for stroke? *Trends Neurosci.* *30*, 433–439.
- Sepasi Tehrani, H., and Moosavi-Movahedi, A.A. (2018). Catalase and its mysteries. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *140*, 5–12.
- Serrander, L., Cartier, L., Bedard, K., Banfi, B., Lardy, B., Plastre, O., Sienkiewicz, A., Fórró, L., Schlegel, W., and Krause, K.-H. (2007). NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem. J.* *406*, 105–114.
- Serteser, M., Ozben, T., Gumuslu, S., Balkan, S., and Balkan, E. (2002). Lipid Peroxidation in Rat Brain During Focal Cerebral Ischemia: Prevention of Malondialdehyde and Lipid Conjugated Diene Production by a Novel Antiepileptic, Lamotrigine. *NeuroToxicology* *23*, 111–119.
- Sharma, R., Sharma, R., Khaket, T.P., Dutta, C., Chakraborty, B., and Mukherjee, T.K. (2017). Breast cancer metastasis: Putative therapeutic role of vascular cell adhesion molecule-1. *Cell. Oncol. Dordr.* *40*, 199–208.
- Sharp, C.D., Hines, I., Houghton, J., Warren, A., Jackson, T.H., Jawahar, A., Nanda, A., Elrod, J.W., Long, A., Chi, A., et al. (2003). Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *285*, H2592-2598.
- Sharpe, P.C., Mulholland, C., and Trinick, T. (1994). Ascorbate and malondialdehyde in stroke patients. *Ir. J. Med. Sci.* *163*, 488–491.

- Shcherbakov, A.B., Zholobak, N.M., Baranchikov, A.E., Ryabova, A.V., and Ivanov, V.K. (2015). Cerium fluoride nanoparticles protect cells against oxidative stress. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* *50*, 151–159.
- Sheng, H., Bart, R.F. de, Oury, T.D., Pearlstein, R.D., and Warner, D.S. (1999). Mice overexpressing extracellular superoxide dismutase have increased resistance to focal cerebral ischemia. *Neuroscience* *88*, 185–191.
- Shi, S., Yang, W., Tu, X., Wang, C., Chen, C., and Chen, Y. (2013). 5-Lipoxygenase inhibitor zileuton inhibits neuronal apoptosis following focal cerebral ischemia. *Inflammation* *36*, 1209–1217.
- Shinohara, Y., Saito, I., Kobayashi, S., and Uchiyama, S. (2009). Edaravone (radical scavenger) versus sodium ozagrel (antiplatelet agent) in acute noncardioembolic ischemic stroke (EDO trial). *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* *27*, 485–492.
- Shirley, R., Ord, E.N.J., and Work, L.M. (2014). Oxidative Stress and the Use of Antioxidants in Stroke. *Antioxid. Basel Switz.* *3*, 472–501.
- Shuaib, A., Lees, K.R., Lyden, P., Grotta, J., Davalos, A., Davis, S.M., Diener, H.-C., Ashwood, T., Wasiewski, W.W., Emeribe, U., et al. (2007). NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* *357*, 562–571.
- Siao, C.-J., and Tsirka, S.E. (2002). Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 3352–3358.
- Sierra, C., Coca, A., and Schiffrin, E.L. (2011). Vascular mechanisms in the pathogenesis of stroke. *Curr. Hypertens. Rep.* *13*, 200–207.
- Sies (2007). *Encyclopedia of Stress - 2nd Edition*.
- Sies, H. (2014). Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* *289*, 8735–8741.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* *4*, 180–183.
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr. Opin. Toxicol.* *7*, 122–126.
- Sies, H., and Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *311*, 617–631.
- Sies, H., Berndt, C., and Jones, D.P. (2017). Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* *86*, 715–748.
- Siesjö, B.K., Bengtsson, F., Grampp, W., and Theander, S. (1989). Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *568*, 234–251.
- Silva, B.C., de Miranda, A.S., Rodrigues, F.G., Silveira, A.L.M., Resende, G.H. de S., Moraes, M.F.D., de Oliveira, A.C.P., Parreiras, P.M., Barcelos, L. da S., Teixeira, M.M., et al. (2015). The 5-lipoxygenase (5-LOX) Inhibitor Zileuton Reduces Inflammation and Infarct Size with Improvement in Neurological Outcome Following Cerebral Ischemia. *Curr. Neurovasc. Res.* *12*, 398–403.
- Singh, S., Kumar, A., Karakoti, A., Seal, S., and Self, W.T. (2010). Unveiling the mechanism of uptake and sub-cellular distribution of cerium oxide nanoparticles. *Mol. Biosyst.* *6*, 1813–1820.

Singh, S., Ly, A., Das, S., Sakthivel, T.S., Barkam, S., and Seal, S. (2018). Cerium oxide nanoparticles at the nano-bio interface: size-dependent cellular uptake. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* *46*, S956–S963.

Sinha, K., Chaudhary, G., and Gupta, Y.K. (2002). Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci.* *71*, 655–665.

Smith, W.S., Sung, G., Saver, J., Budzik, R., Duckwiler, G., Liebeskind, D.S., Lutsep, H.L., Rymer, M.M., Higashida, R.T., Starkman, S., et al. (2008). Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: final results of the Multi MERCI trial. *Stroke* *39*, 1205–1212.

Smith Wade S., and Yan Bernard (2015). REVASCAT Trial. *Stroke* *46*, 3012–3013.

Soloman, R., and Gabizon, A.A. (2008). Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: focus on pegylated liposomal Doxorubicin. *Clin. Lymphoma Myeloma* *8*, 21–32.

Sotgiu, S., Zanda, B., Marchetti, B., Fois, M.L., Arru, G., Pes, G.M., Salaris, F.S., Arru, A., Pirisi, A., and Rosati, G. (2006). Inflammatory biomarkers in blood of patients with acute brain ischemia. *Eur. J. Neurol.* *13*, 505–513.

Spickett, C.M., and Pitt, A.R. (2015). Oxidative lipidomics coming of age: advances in analysis of oxidized phospholipids in physiology and pathology. *Antioxid. Redox Signal.* *22*, 1646–1666.

Spranger, M., Krempien, S., Schwab, S., Donneberg, S., and Hacke, W. (1997). Superoxide dismutase activity in serum of patients with acute cerebral ischemic injury. Correlation with clinical course and infarct size. *Stroke* *28*, 2425–2428.

Squadrito, G.L., and Pryor, W.A. (1998). Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* *25*, 392–403.

Srinivas, A., Rao, P.J., Selvam, G., Murthy, P.B., and Reddy, P.N. (2011). Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats. *Toxicol. Lett.* *205*, 105–115.

Stadtman, E.R., and Berlett, B.S. (1991). Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J. Biol. Chem.* *266*, 17201–17211.

Stoll, G., Jander, S., and Schroeter, M. (1998). Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog. Neurobiol.* *56*, 149–171.

Stone, J.A., Willey, J.Z., Keyrouz, S., Butera, J., McTaggart, R.A., Cutting, S., Silver, B., Thompson, B., Furie, K.L., and Yaghi, S. (2017). Therapies for Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke. *Curr. Treat. Options Neurol.* *19*, 1.

Storm, G., Belliot, S.O., Daemen, T., and Lasic, D.D. (1995). Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *17*, 31–48.

Strand T (1992). Evaluation of long-term outcome and safety after hemodilution therapy in acute ischemic stroke. *Stroke* *23*, 657–662.

Strbian, D., Sairanen, T., Silvennoinen, H., Salonen, O., and Lindsberg, P.J. (2014). Intravenous thrombolysis of basilar artery occlusion: thrombus length versus recanalization success. *Stroke* *45*, 1733–1738.

- Su, Y. (2014). Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by protein-protein interaction. *Curr. Pharm. Des.* 20, 3514–3520.
- Su, L., Zhen, G., Zhang, L., Zhao, Y., Niu, D., and Chai, X. (2015). The use of the core-shell structure of zero-valent iron nanoparticles (NZVI) for long-term removal of sulphide in sludge during anaerobic digestion. *Environ. Sci. Process. Impacts* 17, 2013–2021.
- Sughrue, M.E., Mehra, A., Connolly, E.S., and D'Ambrosio, A.L. (2004). Anti-adhesion molecule strategies as potential neuroprotective agents in cerebral ischemia: a critical review of the literature. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* 53, 497–508.
- Sugimoto, K., and Iadecola, C. (2003). Delayed effect of administration of COX-2 inhibitor in mice with acute cerebral ischemia. *Brain Res.* 960, 273–276.
- Sumii, T., and Lo, E.H. (2002). Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 33, 831–836.
- Sun, C., Li, H., and Chen, L. (2012). Nanostructured ceria-based materials: synthesis, properties, and applications. *Energy Environ. Sci.* 5, 8475–8505.
- Sun, M.-S., Jin, H., Sun, X., Huang, S., Zhang, F.-L., Guo, Z.-N., and Yang, Y. (2018). Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy.
- Sun, Y., Feng, X., Ding, Y., Li, M., Yao, J., Wang, L., and Gao, Z. (2019a). Phased Treatment Strategies for Cerebral Ischemia Based on Glutamate Receptors. *Front. Cell. Neurosci.* 13.
- Sun, Z., Han, Y., Song, S., Chen, T., Han, Y., and Liu, Y. (2019b). Activation of GPR81 by lactate inhibits oscillatory shear stress-induced endothelial inflammation by activating the expression of KLF2. *IUBMB Life*.
- Supanc, V., Biloglav, Z., Kes, V.B., and Demarin, V. (2011). Role of cell adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Ann. Saudi Med.* 31, 365–370.
- Sussman, E.S., and Connolly, E.S. (2013). Hemorrhagic transformation: a review of the rate of hemorrhage in the major clinical trials of acute ischemic stroke. *Front. Neurol.* 4, 69.
- Suzuki, T., Kosacki, I., Anderson, H.U., and Colomban, P. (2001). Electrical Conductivity and Lattice Defects in Nanocrystalline Cerium Oxide Thin Films. *J. Am. Ceram. Soc.* 84, 2007–2014.
- Suzuki, T., Mower, H.F., Friesen, M.D., Gilibert, I., Sawa, T., and Ohshima, H. (2004). Nitration and nitrosation of N-acetyl-L-tryptophan and tryptophan residues in proteins by various reactive nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 671–681.
- Suzuki, Y., Hattori, K., Hamanaka, J., Murase, T., Egashira, Y., Mishiro, K., Ishiguro, M., Tsuruma, K., Hirose, Y., Tanaka, H., et al. (2012). Pharmacological inhibition of TLR4-NOX4 signal protects against neuronal death in transient focal ischemia. *Sci. Rep.* 2, 896.
- Suzuki, Y., Nagai, N., and Umemura, K. (2016). A Review of the Mechanisms of Blood-Brain Barrier Permeability by Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment for Cerebral Ischemia. *Front. Cell. Neurosci.* 10.

Swanson, R.A., Ying, W., and Kauppinen, T.M. (2004). Astrocyte Influences on Ischemic Neuronal Death.

Swindle, E.J., Coleman, J.W., DeLeo, F.R., and Metcalfe, D.D. (2007). FcepsilonRI- and Fcgamma receptor-mediated production of reactive oxygen species by mast cells is lipoxygenase- and cyclooxygenase-dependent and NADPH oxidase-independent. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *179*, 7059–7071.

Sydserrf, S.G., Borelli, A.R., Green, A.R., and Cross, A.J. (2002). Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat; studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window. *Br. J. Pharmacol.* *135*, 103–112.

Szalay, G., Martinecz, B., Lénárt, N., Környei, Z., Orsolits, B., Judák, L., Császár, E., Fekete, R., West, B.L., Katona, G., et al. (2016). Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat. Commun.* *7*, 11499.

Taheraghdam, A.A., Sharifipour, E., Pashapour, A., Namdar, S., Hatami, A., Houshmandzad, S., Sadeghihokmabadi, E., Tazik, M., Rikhtegar, R., and Mahmoodpoor, A. (2014). Allopurinol as a preventive contrivance after acute ischemic stroke in patients with a high level of serum uric acid: a randomized, controlled trial. *Med. Princ. Pract. Int. J. Kuwait Univ. Health Sci. Cent.* *23*, 134–139.

Takamatsu, H., Kondo, K., Ikeda, Y., and Umemura, K. (1998). Neuroprotective effects depend on the model of focal ischemia following middle cerebral artery occlusion. *Eur. J. Pharmacol.* *362*, 137–142.

Takizawa, S., Fukuyama, N., Hirabayashi, H., Nakazawa, H., and Shinohara, Y. (1999). Dynamics of Nitrotyrosine Formation and Decay in Rat Brain during Focal Ischemia-Reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *19*, 667–672.

Tan, F., Zhang, Y., Wang, J., Wei, J., Cai, Y., and Qian, X. (2008). An efficient method for dephosphorylation of phosphopeptides by cerium oxide. *J. Mass Spectrom.* *43*, 628–632.

Tan, S., Wang, D., Liu, M., Zhang, S., Wu, B., and Liu, B. (2014). Frequency and predictors of spontaneous hemorrhagic transformation in ischemic stroke and its association with prognosis. *J. Neurol.* *261*, 905–912.

Tănăsescu, R., Nicolau, A., Ticmeanu, M., Luca, D., Caraiola, S., Cojocaru, I.M., Frăsineanu, A., Ionescu, R., Hristea, A., Ene, A., et al. (2008). An immunological approach to cerebral ischemia (I). Immune cells and adhesion molecules. *Romanian J. Intern. Med. Rev. Roum. Med. Interne* *46*, 3–8.

Tarnuzzer, R.W., Colon, J., Patil, S., and Seal, S. (2005). Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Lett.* *5*, 2573–2577.

Thai, S.-F., Wallace, K.A., Jones, C.P., Ren, H., Castellon, B.T., Crooks, J., Grulke, E.A., and Kitchin, K.T. (2015). Differential Genomic Effects on Signaling Pathways by Two Different CeO₂ Nanoparticles in HepG2 Cells.

Thiebaut, A.M., Gauberti, M., Ali, C., Martinez De Lizarrondo, S., Vivien, D., Yepes, M., and Roussel, B.D. (2018). The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. *Lancet Neurol.* *17*, 1121–1132.

Thiyagarajan, M., Kaul, C.L., and Sharma, S.S. (2004). Neuroprotective efficacy and therapeutic time window of peroxyxynitrite decomposition catalysts in focal cerebral ischemia in rats#. *Br. J. Pharmacol.* *142*, 899–911.

- Tien, M., Berlett, B.S., Levine, R.L., Chock, P.B., and Stadtman, E.R. (1999). Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 7809–7814.
- Tománek, D., Jorio, A., Dresselhaus, M.S., and Dresselhaus, G. (2008). Introduction to the Important and Exciting Aspects of Carbon-Nanotube Science and Technology. In *Carbon Nanotubes: Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications*, A. Jorio, G. Dresselhaus, and M.S. Dresselhaus, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–12.
- Tomimoto, H., Shibata, M., Ihara, M., Akiguchi, I., Ohtani, R., and Budka, H. (2002). A comparative study on the expression of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase during cerebral ischemia in humans. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *104*, 601–607.
- Torrano, A.A., Pereira, Â.S., Oliveira, O.N., and Barros-Timmons, A. (2013). Probing the interaction of oppositely charged gold nanoparticles with DPPG and DPPC Langmuir monolayers as cell membrane models. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *108*, 120–126.
- Torres-Cuevas, I., Kuligowski, J., Cárcel, M., Cháfer-Pericás, C., Asensi, M., Solberg, R., Cubells, E., Nuñez, A., Saugstad, O.D., Vento, M., et al. (2016). Protein-bound tyrosine oxidation, nitration and chlorination by-products assessed by ultraperformance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* *913*, 104–110.
- Townsend, D.M., Lushchak, V.I., and Cooper, A.J.L. (2014). A comparison of reversible versus irreversible protein glutathionylation. *Adv. Cancer Res.* *122*, 177–198.
- Toyoda, T., and Lee, K.S. (1997). Differential induction of superoxide dismutase in core and penumbra regions after transient focal ischemia in the rat neocortex. *Neurosci. Lett.* *235*, 29–32.
- Toyoda, K., Fujii, K., Kamouchi, M., Nakane, H., Arihiro, S., Okada, Y., Ibayashi, S., and Iida, M. (2004). Free radical scavenger, edaravone, in stroke with internal carotid artery occlusion. *J. Neurol. Sci.* *221*, 11–17.
- Traber, M.G., and Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic. Biol. Med.* *43*, 4–15.
- Tseng, M.T., Lu, X., Duan, X., Hardas, S.S., Sultana, R., Wu, P., Unrine, J.M., Graham, U., Butterfield, D.A., Grulke, E.A., et al. (2012). Alteration of hepatic structure and oxidative stress induced by intravenous nanoceria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *260*, 173–182.
- Tsuji, K., Aoki, T., Tejima, E., Arai, K., Lee, S.-R., Atochin, D.N., Huang, P.L., Wang, X., Montaner, J., and Lo, E.H. (2005). Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke* *36*, 1954–1959.
- Tu, X.-K., Zhang, H.-B., Shi, S.-S., Liang, R.-S., Wang, C.-H., Chen, C.-M., and Yang, W.-Z. (2016). 5-LOX Inhibitor Zileuton Reduces Inflammatory Reaction and Ischemic Brain Damage Through the Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway. *Neurochem. Res.* *41*, 2779–2787.
- Turner, R., and Vink, R. (2007). Inhibition of neurogenic inflammation as a novel treatment for ischemic stroke. *Timely Top. Med. Cardiovasc. Dis.* *11*, E24.
- Turner, R.J., and Sharp, F.R. (2016). Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Front. Cell. Neurosci.* *10*.

- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344.
- Tyurin-Kuzmin, P.A., Zhdanovskaya, N.D., Sukhova, A.A., Sagaradze, G.D., Albert, E.A., Ageeva, L.V., Sharonov, G.V., Vorotnikov, A.V., and Tkachuk, V.A. (2016). Nox4 and Duox1/2 Mediate Redox Activation of Mesenchymal Cell Migration by PDGF. *PLoS One* 11, e0154157.
- Uemura, Y., Miller, J.M., Matson, W.R., and Beal, M.F. (1991). Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke* 22, 1548–1553.
- Ursini, F., Maiorino, M., and Forman, H.J. (2016). Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biol.* 8, 205–215.
- Valentino, F., Gentile, L., Terruso, V., Mastrilli, S., Aridon, P., Ragonese, P., Sarno, C., Savettieri, G., and D'Amelio, M. (2017). Frequency and determinants for hemorrhagic transformation of posterior cerebral stroke. *BMC Res. Notes* 10.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- Vani, J.R., Mohammadi, M.T., Foroshani, M.S., and Jafari, M. (2016). Polyhydroxylated fullerene nanoparticles attenuate brain infarction and oxidative stress in rat model of ischemic stroke. *EXCLI J.* 15, 378–390.
- Vasir, J.K., and Labhsetwar, V. (2008). Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles. *Biomaterials* 29, 4244–4252.
- Ventola, C.L. (2012). The nanomedicine revolution: part 1: emerging concepts. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* 37, 512–525.
- Ventola, C.L. (2017). Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* 42, 742–755.
- Vercellino, M., Trebini, C., Capello, E., Mancardi, G.L., Giordana, M.T., and Cavalla, P. (2017). Inflammatory responses in Multiple Sclerosis normal-appearing white matter and in non-immune mediated neurological conditions with wallerian axonal degeneration: A comparative study. *J. Neuroimmunol.* 312, 49–58.
- Vétérinaire.fr, L.P. Les nanomédicaments, alliés de la médecine de demain ? - La Semaine Vétérinaire n° 1534 du 05/04/2013.
- Vincent, A., Babu, S., Heckert, E., Dowding, J., Hirst, S.M., Inerbaev, T.M., Self, W.T., Reilly, C.M., Masunov, A.E., Rahman, T.S., et al. (2009). Protonated nanoparticle surface governing ligand tethering and cellular targeting. *ACS Nano* 3, 1203–1211.
- Virgili, M., Contestabile, A., and Barnabei, O. (1995). Simultaneous blockade of non-NMDA ionotropic receptors and NMDA receptor-associated ionophore partially protects hippocampal slices from protein synthesis impairment due to simulated ischemia. *Hippocampus* 5, 91–97.
- Vivien, D., Gauberti, M., Montagne, A., Defier, G., and Touzé, E. (2011). Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 2119–2134.

- Vladimirov, Y.A., and Proskurnina, E.V. (2009). Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochem. Biokhimiia* 74, 1545–1566.
- Wacker, M.G. (2014). Nanotherapeutics—Product Development Along the “Nanomaterial” Discussion. *J. Pharm. Sci.* 103, 777–784.
- Wacker, M., Zensi, A., Kufleitner, J., Ruff, A., Schütz, J., Stockburger, T., Marstaller, T., and Vogel, V. (2011). A toolbox for the upscaling of ethanolic human serum albumin (HSA) desolvation. *Int. J. Pharm.* 414, 225–232.
- Wang, J.-X., Gao, J., Ding, S.-L., Wang, K., Jiao, J.-Q., Wang, Y., Sun, T., Zhou, L.-Y., Long, B., Zhang, X.-J., et al. (2015a). Oxidative Modification of miR-184 Enables It to Target Bcl-xL and Bcl-w. *Mol. Cell* 59, 50–61.
- Wang, W., Li, M., Chen, Q., and Wang, J. (2015b). Hemorrhagic Transformation After Tissue Plasminogen Activator Reperfusion Therapy for Ischemic Stroke: Mechanisms, Models, and Biomarkers. *Mol. Neurobiol.* 52, 1572–1579.
- Wang, X., Lee, S.-R., Arai, K., Lee, S.-R., Tsuji, K., Rebeck, G.W., and Lo, E.H. (2003). Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat. Med.* 9, 1313–1317.
- Wang, Z., Shi, L., Xu, S., and Zhang, J. (2017). Cerebrolysin for functional recovery in patients with acute ischemic stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Drug Des. Devel. Ther.* 11, 1273–1282.
- Warach, S.J., Luby, M., Albers, G.W., Bammer, R., Bivard, A., Campbell, B.C.V., Derdeyn, C., Heit, J.J., Khatri, P., Lansberg, M.G., et al. (2016). Acute Stroke Imaging Research Roadmap III Imaging Selection and Outcomes in Acute Stroke Reperfusion Clinical Trials: Consensus Recommendations and Further Research Priorities. *Stroke* 47, 1389–1398.
- Wardlaw, J.M. (2001). Overview of Cochrane thrombolysis meta-analysis. *Neurology* 57, S69-76.
- Wardlaw, J.M., Murray, V., Berge, E., and Zoppo, G.J. del (2014). Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst. Rev.*
- Wardlaw, J.M., Brazzelli, M., Chappell, F.M., Miranda, H., Shuler, K., Sandercock, P.A.G., and Dennis, M.S. (2015). ABCD2 score and secondary stroke prevention: meta-analysis and effect per 1,000 patients triaged. *Neurology* 85, 373–380.
- Warner, D.S., Sheng, H., and Batinić-Haberle, I. (2004). Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J. Exp. Biol.* 207, 3221–3231.
- Watts, M.E., Pocock, R., and Claudianos, C. (2018). Brain Energy and Oxygen Metabolism: Emerging Role in Normal Function and Disease. *Front. Mol. Neurosci.* 11.
- Wayland, B.B., Minkiewicz, J.V., and Abd-Elmageed, M.E. (1974). Spectroscopic studies for tetraphenylporphyrincobalt(II) complexes of carbon monoxide, nitrogen oxide, molecular oxygen, methylisonitrile, and trimethyl phosphite, and a bonding model for complexes of carbon monoxide, nitrogen oxide, and molecular oxygen with cobalt(II) and iron(II) porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* 96, 2795–2801.

- Weidinger, A., and Kozlov, A.V. (2015). Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* 5, 472–484.
- Weinl, C., Castaneda Vega, S., Riehle, H., Stritt, C., Calaminus, C., Wolburg, H., Mael, S., Breithaupt, A., Gruber, A.D., Wasylyk, B., et al. (2015). Endothelial depletion of murine SRF/MRTF provokes intracerebral hemorrhagic stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 9914–9919.
- Whiteley, W., Lindley, R., Wardlaw, J., Sandercock, P., and IST-3 Collaborative Group (2006). Third international stroke trial. *Int. J. Stroke Off. J. Int. Stroke Soc.* 1, 172–176.
- Whiteley, W.N., Wardlaw, J.M., Dennis, M.S., and Sandercock, P.A.G. (2011). Clinical scores for the identification of stroke and transient ischaemic attack in the emergency department: a cross-sectional study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 82, 1006–1010.
- Wojkowska, D.W., Szpakowski, P., and Glabinski, A. (2017). Interleukin 17A Promotes Lymphocytes Adhesion and Induces CCL2 and CXCL1 Release from Brain Endothelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Wolfram, J., Zhu, M., Yang, Y., Shen, J., Gentile, E., Paolino, D., Fresta, M., Nie, G., Chen, C., Shen, H., et al. (2015). Safety of nanoparticles in medicine. *Curr. Drug Targets* 16, 1671–1681.
- Wong, L.L., Hirst, S.M., Pye, Q.N., Reilly, C.M., Seal, S., and McGinnis, J.F. (2013). Catalytic nanoceria are preferentially retained in the rat retina and are not cytotoxic after intravitreal injection. *PloS One* 8, e58431.
- Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Tieleman, D.P., and Monticelli, L. (2007). Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* 93, 4225–4236.
- Wood, P.L. (1995). Microglia as a unique cellular target in the treatment of stroke: potential neurotoxic mediators produced by activated microglia. *Neurol. Res.* 17, 242–248.
- van der Worp, H.B., Bär, P.R., Kappelle, L.J., and de Wildt, D.J. (1998). Dietary vitamin E levels affect outcome of permanent focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29, 1002–1005; discussion 1005-1006.
- Wright, A., Bubb, W.A., Hawkins, C.L., and Davies, M.J. (2002). Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochem. Photobiol.* 76, 35–46.
- Wright, A., Hawkins, C.L., and Davies, M.J. (2003). Photo-oxidation of cells generates long-lived intracellular protein peroxides. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 637–647.
- Wyatt, J.S., Edwards, A.D., Azzopardi, D., and Reynolds, E.O. (1989). Magnetic resonance and near infrared spectroscopy for investigation of perinatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Arch. Dis. Child.* 64, 953–963.
- Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J.I., Zink, J.I., and Nel, A.E. (2008). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* 2, 2121–2134.
- Xie, X., Atkins, E., Lv, J., Bennett, A., Neal, B., Ninomiya, T., Woodward, M., MacMahon, S., Turnbull, F., Hillis, G.S., et al. (2016). Effects of intensive blood pressure lowering on cardiovascular and renal outcomes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet Lond. Engl.* 387, 435–443.

- Xu, C., and Qu, X. (2014). Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications. *NPG Asia Mater.* 6, e90.
- Xu, J., Wang, X., Yin, H., Cao, X., Hu, Q., Lv, W., Xu, Q., Gu, Z., and Xin, H. (2019). Sequentially Site-Specific Delivery of Thrombolytics and Neuroprotectant for Enhanced Treatment of Ischemic Stroke. *ACS Nano* 13, 8577–8588.
- Xue, Y., Luan, Q., Yang, D., Yao, X., and Zhou, K. (2011). Direct Evidence for Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Cerium Oxide Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* 115, 4433–4438.
- Yaghi, S., Willey, J.Z., Cucchiara, B., Goldstein, J.N., Gonzales, N.R., Khatri, P., Kim, L.J., Mayer, S.A., Sheth, K.N., Schwamm, L.H., et al. (2017). Treatment and Outcome of Hemorrhagic Transformation After Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 48, e343–e361.
- Yamada, I., Fukunari, A., Osajima, T., Kamezawa, M., Mori, H., and Iwane, J. (2004). Pharmacokinetics/pharmacodynamics of Y-700, a novel xanthine oxidase inhibitor, in rats and man. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23, 1123–1125.
- Yamaguchi, T., Sano, K., Takakura, K., Saito, I., Shinohara, Y., Asano, T., and Yasuhara, H. (1998). Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. *Stroke* 29, 12–17.
- Yamato, M., Egashira, T., and Utsumi, H. (2003). Application of in vivo ESR spectroscopy to measurement of cerebrovascular ROS generation in stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1619–1631.
- Yang, Y., and Rosenberg, G.A. (2011). MMP-mediated disruption of claudin-5 in the blood-brain barrier of rat brain after cerebral ischemia. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 762, 333–345.
- Yang, B., Chen, Y., and Shi, J. (2019a). Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem. Rev.* 119, 4881–4985.
- Yang, C., Hawkins, K.E., Doré, S., and Candelario-Jalil, E. (2019b). Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 316, C135–C153.
- Yang, J.-X., Pan, Y.-Y., Ge, J.-H., Chen, B., Mao, W., Qiu, Y.-G., and Wang, X.-X. (2016). Tanshinone II A Attenuates TNF- α -Induced Expression of VCAM-1 and ICAM-1 in Endothelial Progenitor Cells by Blocking Activation of NF- κ B. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 40, 195–206.
- Yang, Y., Estrada, E.Y., Thompson, J.F., Liu, W., and Rosenberg, G.A. (2007). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 697–709.
- Yepes, M., Roussel, B.D., Ali, C., and Vivien, D. (2009). Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci.* 32, 48–55.
- Ying, W., Han, S.-K., Miller, J.W., and Swanson, R.A. (1999). Acidosis Potentiates Oxidative Neuronal Death by Multiple Mechanisms. *J. Neurochem.* 73, 1549–1556.

- Yokel, R.A., Au, T.C., MacPhail, R., Hardas, S.S., Butterfield, D.A., Sultana, R., Goodman, M., Tseng, M.T., Dan, M., Haghazadeh, H., et al. (2012). Distribution, elimination, and biopersistence to 90 days of a systemically introduced 30 nm ceria-engineered nanomaterial in rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *127*, 256–268.
- Yokel, R.A., Tseng, M.T., Dan, M., Unrine, J.M., Graham, U.M., Wu, P., and Grulke, E.A. (2013). Biodistribution and biopersistence of ceria engineered nanomaterials: size dependence. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *9*, 398–407.
- Yoshimoto, T., Houkin, K., Tada, M., and Abe, H. (1997). Induction of cytokines, chemokines and adhesion molecule mRNA in a rat forebrain reperfusion model. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *93*, 154–158.
- Yoshioka, H., Niizuma, K., Katsu, M., Okami, N., Sakata, H., Kim, G.S., Narasimhan, P., and Chan, P.H. (2011). NADPH oxidase mediates striatal neuronal injury after transient global cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *31*, 868–880.
- Yu, Y., Han, Q., Ding, X., Chen, Q., Ye, K., Zhang, S., Yan, S., Campbell, B.C.V., Parsons, M.W., Wang, S., et al. (2016). Defining Core and Penumbra in Ischemic Stroke: A Voxel- and Volume-Based Analysis of Whole Brain CT Perfusion. *Sci. Rep.* *6*.
- Yun, M.R., Park, H.M., Seo, K.W., Lee, S.J., Im, D.S., and Kim, C.D. (2010). 5-Lipoxygenase plays an essential role in 4-HNE-enhanced ROS production in murine macrophages via activation of NADPH oxidase. *Free Radic. Res.* *44*, 742–750.
- Yun, X., Maximov, V.D., Yu, J., Zhu, H., Vertegel, A.A., and Kindy, M.S. (2013). Nanoparticles for targeted delivery of antioxidant enzymes to the brain after cerebral ischemia and reperfusion injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *33*, 583–592.
- Zehendner, C.M., Librizzi, L., Hedrich, J., Bauer, N.M., Angamo, E.A., de Curtis, M., and Luhmann, H.J. (2013). Moderate hypoxia followed by reoxygenation results in blood-brain barrier breakdown via oxidative stress-dependent tight-junction protein disruption. *PloS One* *8*, e82823.
- Zhang, L.-H., and Wei, E.-Q. (2003). Neuroprotective effect of ONO-1078, a leukotriene receptor antagonist, on transient global cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* *24*, 1241–1247.
- Zhang, Z.G., and Chopp, M. (2009). Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol.* *8*, 491–500.
- Zhang, C., An, J., Haile, W.B., Echeverry, R., Strickland, D.K., and Yepes, M. (2009a). Microglial low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates the effect of tissue-type plasminogen activator on matrix metalloproteinase-9 activity in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *29*, 1946–1954.
- Zhang, C., Chopp, M., Cui, Y., Wang, L., Zhang, R., Zhang, L., Lu, M., Szalad, A., Doppler, E., Hitzl, M., et al. (2010). Cerebrolysin enhances neurogenesis in the ischemic brain and improves functional outcome after stroke. *J. Neurosci. Res.* *88*, 3275–3281.
- Zhang, C., Qin, Y.-Y., Chen, Q., Jiang, H., Chen, X.-Z., Xu, C.-L., Mao, P.-J., He, J., and Zhou, Y.-H. (2014). Alcohol intake and risk of stroke: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int. J. Cardiol.* *174*, 669–677.

- Zhang, F., Chen, C.-H., Raitano, J.M., Hanson, J.C., Caliebe, W.A., Khalid, S., and Chan, S.-W. (2006). Phase stability in ceria-zirconia binary oxide nanoparticles: The effect of the Ce³⁺ concentration and the redox environment. *J. Appl. Phys.* *99*, 084313.
- Zhang, H.-F., Li, T.-B., Liu, B., Lou, Z., Zhang, J.-J., Peng, J.-J., Zhang, X.-J., Ma, Q.-L., Peng, J., and Luo, X.-J. (2015). Inhibition of myosin light chain kinase reduces NADPH oxidase-mediated oxidative injury in rat brain following cerebral ischemia/reperfusion. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *388*, 953–963.
- Zhang, Q.-G., Raz, L., Wang, R., Han, D., Sevilla, L.D., Yang, F., Vadlamudi, R.K., and Brann, D.W. (2009b). Estrogen Attenuates Ischemic Oxidative Damage via an Estrogen Receptor α -Mediated Inhibition of NADPH Oxidase Activation. *J. Neurosci.* *29*, 13823–13836.
- Zhang, Q.-G., Laird, M.D., Han, D., Nguyen, K., Scott, E., Dong, Y., Dhandapani, K.M., and Brann, D.W. (2012). Critical Role of NADPH Oxidase in Neuronal Oxidative Damage and Microglia Activation following Traumatic Brain Injury. *PLOS ONE* *7*, e34504.
- Zhang, R.L., Zhang, Z.G., and Chopp, M. (1999). Increased therapeutic efficacy with rt-PA and anti-CD18 antibody treatment of stroke in the rat. *Neurology* *52*, 273–279.
- Zhang, S., An, Q., Wang, T., Gao, S., and Zhou, G. (2018a). Autophagy- and MMP-2/9-mediated Reduction and Redistribution of ZO-1 Contribute to Hyperglycemia-increased Blood-Brain Barrier Permeability During Early Reperfusion in Stroke. *Neuroscience* *377*, 126–137.
- Zhang, T., Li, C.-Y., Jia, J.-J., Chi, J.-S., Zhou, D., Li, J.-Z., Liu, X.-M., Zhang, J., and Yi, L. (2018b). Combination Therapy with LXW7 and Ceria Nanoparticles Protects against Acute Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Curr. Med. Sci.* *38*, 144–152.
- Zhang, X.-H., Lei, H., Liu, A.-J., Zou, Y.-X., Shen, F.-M., and Su, D.-F. (2011). Increased Oxidative Stress Is Responsible for Severer Cerebral Infarction in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats.
- Zhou, L., and Zhu, D.-Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide Biol. Chem.* *20*, 223–230.
- Zhou, M., and Baudry, M. (2006). Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 2956–2963.
- Zhou, D., Fang, T., Lu, L.-Q., and Yi, L. (2016). Neuroprotective potential of cerium oxide nanoparticles for focal cerebral ischemic stroke. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* *36*, 480–486.
- Zhou, X., Wong, L.L., Karakoti, A.S., Seal, S., and McGinnis, J.F. (2011). Nanoceria inhibit the development and promote the regression of pathologic retinal neovascularization in the Vldlr knockout mouse. *PLoS One* *6*, e16733.
- Zinkstok, S.M., Roos, Y.B., and ARTIS investigators (2012). Early administration of aspirin in patients treated with alteplase for acute ischaemic stroke: a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* *380*, 731–737.
- (1996). A randomized trial of tirilazad mesylate in patients with acute stroke (RANTTAS). The RANTTAS Investigators. *Stroke* *27*, 1453–1458.

(1997). Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke* 28, 2109–2118.

(2000). Tirilazad mesylate in acute ischemic stroke: A systematic review. Tirilazad International Steering Committee. *Stroke* 31, 2257–2265.

(2019). OMS | Accident vasculaire cérébral (AVC).

OMS | Les 10 principales causes de mortalité.

Inserm | Accident vasculaire cérébral (AVC).

France AVC.

Stroke Association.

Home - ClinicalTrials.gov.