



Hémorragie intracérébrale spontanée : développement d'un traitement pour les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques et physiopathologie de l'anévrisme intracérébral

Estelle Louet

► To cite this version:

Estelle Louet. Hémorragie intracérébrale spontanée : développement d'un traitement pour les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques et physiopathologie de l'anévrisme intracérébral. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC413 . tel-03934597

HAL Id: tel-03934597

<https://theses.hal.science/tel-03934597>

Submitted on 11 Jan 2023

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.

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Hémorragie intracérébrale spontanée : développement d'un traitement pour les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques et physiopathologie de l'anévrisme intracérébral

**Présentée et soutenue par
ESTELLE LOUET**

**Thèse à caractère confidentiel soutenue le 29/09/2021
devant le jury composé de**

M. TAE-HEE CHO	Professeur des universités, Université Lyon 1 Claude Bernard	Rapporteur du jury
MME CÉCILE OURY	Directrice de recherche, Université de Liège	Rapporteur du jury
MME CHARLOTTE BARBIER	Praticien hospitalier, CHU de Caen	Membre du jury
M. DIDIER LETOURNEUR	Directeur de recherche, Université Paris 7 Paris Diderot	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Président du jury
M. CYRILLE ORSET	Chargé de recherche HDR, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par CYRILLE ORSET, Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques

Hémorragie intracérébrale spontanée : développement d'un traitement pour les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques et physiopathologie de l'anévrisme intracérébral

Estelle Louet

Remerciements

Je souhaite remercier Op2Lysis de m'avoir accueillie au sein de leur entreprise et de m'avoir donné l'opportunité de faire partie de ce formidable projet.

Je souhaite également remercier Denis Vivien, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire PhIND et d'avoir suivi avec intérêt et bienveillance l'avancement de mes travaux de thèse. Travaux qui n'auraient pas pu voir le jour sans le considérable éventail de techniques mis à ma disposition au laboratoire.

Je remercie Cyrille Orset pour son soutien et l'encadrement de cette thèse, pour la transmission de connaissances théoriques et techniques requises pour la physio, et surtout pour m'avoir fait confiance dans la réalisation de ce projet de thèse.

Mes remerciements vont également aux rapporteurs de cette thèse, le Professeur Denis Vivien et Dr Cécile OURY pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce travail. Je souhaite sincèrement remercier Professeur Didier LETOUNEUR, Dr Charlotte BARBIER, Dr. Tae-Hee CHO, d'avoir accepté de faire partie de mon jury et pour leur présence au sein de ce jury.

Merci à toutes les personnes de l'unité « PhIND » auprès desquelles j'ai pu trouver de l'aide en cas de besoin. Merci au personnel du CURB, plus généralement merci à tous ceux ayant permis de près ou de loin la réalisation de ce travail de thèse.

Je voudrais également remercier Mélina qui a su reprendre la main sur mes expériences en cours au sein d'Op2Lysis pour me permettre de me consacrer à la rédaction de ce manuscrit.

I would like to thank Martina G, for her collaboration, her attentive listening and her support thought this period. Hvala!

Merci à Léa et Fatima pour leur écoute et leur aide.

Voglio ringraziare Michele B per il tuo sostegno incondizionato, il tuo aiuto e per la tua ricetta di caffè che mi dà tanta energia !

En dernier, je voudrais également remercier ma famille pour leur formidable support, leur aide et leur compréhension qui m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui.

Avant-propos

J'ai eu la chance de bénéficier d'une thèse en convention CIFRE au sein d'OP2Lysis et de l'unité INSERM U1237. Ce qui m'a permis d'être impliquée dans un projet de recherche appliquée ainsi que dans un second projet de recherche translationnelle fondamentale.

Op2Lysis est une jeune startup qui développe le premier traitement médicamenteux de l'accident vasculaire cérébral de type hémorragique.

L'unité INSERM U1237 « Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders » (PhIND) est dirigée par le professeur Denis Vivien. Cette unité cherche à améliorer la compréhension du tPA et de ses mécanismes d'actions au sein du système nerveux central et de l'unité neurovasculaire, dans des conditions physiologiques et pathologiques, pour améliorer son utilisation en sauvegardant ses effets bénéfiques tout en supprimant ses effets délétères.

Mes travaux de thèse reposent sur l'étude du tPA dans les hémorragies cérébrales spontanées. D'une part, en poursuivant des travaux déjà initiés dans l'unité sur l'impact du tPA dans les anévrismes intracrâniens, afin de comprendre par quel mécanisme ce dernier est impliqué dans cette pathologie. Et d'autre part, en participant au développement d'un thrombolytique formulé pour le traitement des accidents vasculaires cérébraux de type hémorragique.

Ainsi, pour présenter mes travaux de thèse et en faciliter la compréhension, je vais commencer par une introduction concise sur les accidents vasculaires cérébraux et hémorragies cérébrales suivie par la présentation des anévrismes intracrâniens, puis du tPA et de certaines de ses différentes fonctions. Enfin, je présenterai les deux projets constituant mon projet de thèse : l'impact du tPA dans les anévrismes intracrâniens et le développement d'un nouveau produit pour le traitement des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques. Je finirai par une discussion des travaux effectués durant ma thèse et de leurs perspectives.

Bonne Lecture

Résumé

Les hémorragies cérébrales spontanées touchent près de 2 millions de personnes dans le monde par année, avec un taux très élevé de morbidité et de mortalité. Il n'existe actuellement aucun consensus sur le traitement de ces dernières. Les hémorragies cérébrales spontanées sont donc un besoin médical non satisfait avec un fort coup sur le système de santé. La présence du sang dans le tissu cérébral va provoquer majoritairement 2 types de lésions. Le premier est dû à l'impact du volume de sang dans ce tissu créant un effet de masse. Le second est dû à la toxicité du sang dans le tissu. Plusieurs stratégies pour le traitement des hémorragies intracérébrales sont le sujet de nombreuses études cliniques. Ces différentes stratégies visent, soit à la neuroprotection, soit à l'induction de la coagulation afin de diminuer l'impact des deux types de lésions provoqué sur le tissu cérébral. Une autre stratégie est le retrait chirurgical de l'hématome soit en utilisant un appareil spécialisé soit en utilisant un thrombolytique couplé à une intervention minimisant le risque d'endommager le tissu cérébral. Malgré un travail intensif sur la recherche de nouveaux traitements, à l'heure actuelle leurs efficacités n'ont pas fait l'unanimité. Mon projet de thèse était de travailler au développement d'un nouveau produit alliant un thrombolytique de nouvelle génération couplé à une formulation permettant son relargage progressif. Les résultats obtenus dans ce projet de thèse ont permis de démontrer la preuve de concept pour l'utilisation d'une formulation à relargage progressif d'un thrombolytique afin d'obtenir une lyse optimale. Mes résultats ont permis de montrer la supériorité de l'O2L-001 et de ce fait, un nouvel espoir pour le traitement des hémorragies intracérébrales.

Les anévrismes intracrâniens sont une malformation affectant les artères cérébrales. Avec une prévalence de 3 à 5 % dans la population générale. La majorité des anévrismes intracrâniens reste asymptomatique jusqu'à la rupture. La rupture des anévrismes intracrâniens est la cause la plus commune des hémorragies sous-arachnoïdiennes non traumatiques, avec de lourdes conséquences sur la mortalité et la morbidité des patients. À l'heure actuelle, les seules options de traitement possibles sont des interventions chirurgicales avec des risques non négligeables. De ce fait, une meilleure compréhension de la physiopathologie des anévrismes intracrâniens est cruciale pour un meilleur traitement des patients. Beaucoup d'études se sont focalisées sur une meilleure compréhension de leur pathogenèse, cependant certains doutes persistent sur les mécanismes impliqués dans leur formation et leur rupture. Il a précédemment été démontré que l'activateur tissulaire du plasminogène pouvait être impliqué dans cette pathologie. Dans ce travail de thèse, je me suis focalisée sur la compréhension des mécanismes par lesquels l'activateur tissulaire du plasminogène était impliqué dans cette pathologie. Les résultats obtenus dans mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'interaction tPA-NMAR dans la formation et la rupture des anévrismes. De plus, l'utilisation du Glunomab® permet de réduire l'incidence des anévrismes et leur rupture, ouvrant de nouvelles perspectives de traitement dans cette pathologie.

Summary

Spontaneous intracerebral haemorrhages affect close to 2 million people in the world per year, with high rates of morbidity and mortalities. To this date, there is no consensus on the treatment of the latter. Therefore, intracerebral haemorrhages are an unmet medical need with a high impact on the medical care system. The presence of blood in the cerebral tissue provokes two types of lesions. The first type is due to the impact of the blood volume creating a mass effect on the tissue. The second one is due to the blood haematotoxicity in the cerebral tissue. Various treatment strategies are the subject of clinical trials. One strategy is to diminish the impact of the two lesions type, or by neuroprotection or by the induction of the coagulation. Another strategy is the surgical removal of the clot or by using specialized devices or by using a thrombolytic coupled with a minimally invasive intervention design to decrease the risk of the lesion due to surgery to the cerebral parenchyma. Despite intensive research on the new treatment possibilities, no treatment has made unanimity to this date. My thesis project is to work on the development of a new product composed of a new thrombolytic coupled with a sustain release formulation. The results obtained allowed to demonstrate the proof of concept for the use of a thrombolytic in a sustained release formulation to obtain an optimized lysis. My results allowed me to demonstrate the O2L-001 superiority, therefore a new hope for the treatment of spontaneous intracerebral haemorrhage.

Intracranial aneurysms are malformations affecting cerebral arteries with a prevalence of 3 to 5% in the general population. The majority of intracranial aneurysms are asymptomatic until their rupture, which is the most common cause of subarachnoid haemorrhage with the consequences of mortality and morbidity of patients to these days. The only treatment options possible are surgical interventions with non-negligible risks. Therefore, understanding the biology of this pathology is crucial for better rational patient management. Several studies aim to comprehend their pathogenesis better. However, doubts subsist about the mechanisms underlying the formation and rupture of the aneurysm. It was previously established that tPA could be a factor implicated in this pathology. During this thesis project, my goal was to understand better by which mechanisms the tPA is implicated in this pathology. My results allowed me to show that the interaction between tPA-NMDAR is implicated in aneurysms formation and rupture. Moreover, the use of Glunomab[®] allowed to reduce the incidence of aneurysms and their rupture.

Table des matières

1 Table of Contents

Remerciements	2
Avant-propos.....	3
Résumé.....	4
Summary	5
Table des matières	6
Liste des figures.....	9
Liste des Abréviations	10
Introduction.....	12
2 Les accidents vasculaires cérébraux	12
3 Les accidents vasculaires cérébraux de type hémorragique	13
3.1 Différents sous-types d'hémorragies cérébrales	14
3.2 Étiologie et facteurs de risques des hémorragies cérébrales	15
3.2.1 Facteurs de risques.....	16
4 Les hémorragies intracérébrales parenchymateuses.....	19
5 Hémorragie intraventriculaire	22
6 Essais cliniques et perspectives de traitements	24
7 Les anévrismes généralités	32
7.1 Les différents types d'anévrismes.....	32
8 L'anévrisme intracrânien	34
8.1 Les particularités des vaisseaux intracrâniens	35
8.2 Mécanismes de formation des anévrismes intracrâniens	36
8.3 La croissance des anévrismes intracrâniens	39
8.4 La rupture d'un anévrisme intracrânien	43
8.5 Étiologie des anévrismes intracrâniens.....	46
9 L'activateur tissulaire du plasminogène	48
9.1 La structure du tPA.....	49
9.2 Expression et sécrétion du tPA	50
9.3 Les inhibiteurs du tPA.....	51
9.4 Le rôle du tPA dans le système nerveux central	53
10 L'activateur tissulaire du plasminogène : outil thérapeutique dans les AVC	55

10.1	Le tPA : outil thérapeutique dans les AVC ischémiques	55
10.2	Le tPA : outil thérapeutique dans les AVC hémorragiques.....	55
11	L'activateur tissulaire du plasminogène dans la physiopathologie des anévrismes ...	57
12	Projet de thèse	59
12.1	Développement d'un nouveau produit pour le traitement des accidents vasculaires hémorragiques.....	59
12.2	L'impact du tPA dans l'anévrisme intracrânien	60
13	Article 1: "O2L-001, a sustain release formulation of an optimized tPA for an efficient and safe thrombolysis "	62
	O2L-001, a sustain release formulation of an optimized tPA for an efficient and safe thrombolysis	63
	Abstract	64
	Introduction.....	65
	Material & Methods	67
	Materials	67
	Drugs.....	67
	Whole blood clot model.....	67
	5ml clot treatment.....	68
	1ml whole blood incubation treatments	68
	Rheological measurements.....	68
	O2L-001 dissolution method in a flow-through cell (USP4).....	69
	Thrombolytic activity	69
	Amidolytic activity.....	69
	Plasminogen activation	70
	Statistical analysis	70
	Results:	70
	O2L-001 a more efficient thrombolytic than regular rtPA for clot thrombolysis.....	70
	Extended exposure to plasminogen activator at low concentration allows high thrombolytic activity.....	73
	O2L-001 release profile.....	80
	OptPA is a safer thrombolytic agent than rtPA with similar fibrinolytic potency.....	82
	Discussion	87
	Acknowledgment.....	89
14	Article 2: "tPA-NMDAR signaling blockade reduces the incidence of intracerebral aneurysms"	93

Abstract	96
Introduction.....	97
Material and Methods	99
Wild type and transgenic mice.....	99
Generation of P-Live plasmids	99
Hydrodynamic transfection.....	99
Induction of intracranial aneurysm.....	100
Intravenous antibody injection	100
MRI analysis	100
Animal follow-up and parameters studied.....	100
Immunohistochemistry	102
Statistical analysis	102
Results	104
Inactivation of endogenous tPA protects against IA formation and rupture	104
Vascular tPA contributes to the formation of aneurysms and rupture.....	106
Absence of the Kringle 2 domain delays the onset of aneurysm ruptures	106
Presence of tPA and NMDA receptors (GluN1) in the wall of intracranial aneurysms.....	107
GluN1, a monoclonal antibody that prevents tPA-dependent NMDAR signaling and protects against IA formation and rupture	108
Discussion	111
Acknowledgments.....	113
Author contributions.....	114
Potential conflict of interest	114
References	115
Discussion.....	121
15 Discussion et conclusions : développement d'un nouveau produit pour le traitement des accidents vasculaires hémorragiques au sein d'Op2Lysis	121
16 Discussion et conclusions : l'impact du tPA dans l'anévrisme intracrânien	125
Conclusions.....	129
Bibliographie	131

Liste des figures

Figure 1: Schéma des topographies des différents sous-types d'hémorragies cérébrales. ..	15
Figure 2: Liste non exhaustive des causes d'hémorragies intracérébrales primaire et secondaire.....	16
Figure 3 : Représentation schématique de la lésion primaire et secondaire après une hémorragie intracérébrale.....	21
Figure 4: Système BrainPath ®.....	28
Figure 5 : Système Artemis™.....	28
Figure 6: Exemple de cathéters ventriculaires.....	31
Figure 7: Schéma des deux différents types d'anévrismes pouvant être décrits.	33
Figure 8 : Représentation schématique des différentes méninges et de leurs espaces.....	34
Figure 9: Schéma de la formation, de la croissance et de la rupture d'un anévrisme intracrânien.	38
Figure 10: Représentation schématique de la croissance d'un anévrisme.	42
Figure 11 : Représentation schématique de l'initiation, la croissance et la rupture d'un anévrisme.....	44
Figure 12: Équations utilisées pour le calcul du ratio d'aspect et du ratio de taille.	45
Figure 13: Fonction thrombolytique du tPA.	48
Figure 14 : Représentation schématique du tPA simple chaîne A et double chaîne B après clivage.	50

Liste des Abréviations

AAA	Anévrisme de l'aorte abdominale
ACA	Angiopathie cérébrale amiloïde
AHA	<i>(American heart association)</i>
AI	Anévrisme Intracérébral
ASA	<i>(American stroke association)</i>
AVC	Accident vasculaire cérébral
BHE	Barrière hématoencéphalique
CLEAR	<i>(Clot lysis evaluation accelerated resolution)</i>
CMVL	Cellule musculaire vasculaire Lisse
COX 2	Cyclooxygénase 2
CT- Scan	<i>Computed-tomography-scanner</i>
EGF	<i>(Epithelial growth factor)</i>
FAST	<i>(rFVIIa for Acute Hemorrhagic Stroke Administered at Earliest Time)</i>
GCS	<i>(Glasgow coma scale)</i>
GF	<i>(Growth factor)</i>
HPLC	<i>(High performance liquid chromatography)</i>
HPH	Hydrocéphalie post-hémorragique
ICH	hémorragie Intracérébrale
IL	Interleukine
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IVH	Hémorragie intraventriculaire
JNK	C-jun-N-terminal kinase
KO	<i>(Knock out)</i>
LBS	<i>(Lysine binding site)</i>
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LRP	<i>(Low density lipoprotein receptor-related protein)</i>
MCP-1	<i>(Monocyte chemottractant protein 1)</i>
MI	<i>(Minimally invasive)</i>
MIS	<i>(Minimally invasive Surgery)</i>

MISTIE	<i>(Minimally invasive Surgery Plus rt-PA for ICH Evacuation)</i>
MMP	<i>(Matrix metalloproteinases)</i>
MRS	<i>(Modified rankin Scale)</i>
NF- κ B	<i>(Nuclear factor-Kappa B)</i>
NKCC-1	Co transporteur Na-K-Cl
NMDA	<i>(N-methyl-D-aspartate)</i>
NMDAR	<i>(N-methyl-D-aspartate receptor)</i>
OptPA	<i>(Optimized tPA)</i>
PDGF-CC	<i>(Platelet-derived growth factor-CC)</i>
PET SCAN	<i>(Positron emission tomography Scanner)</i>
PAI-1	<i>(Plasminogene activator Inhibitor 1)</i>
PKD	Polykystose rénale autosomique dominante
PLAT	<i>(Plasminogen activator tissue type gene)</i>
ROS	<i>(Radical oxygen species)</i>
tc-tPA	<i>(Two chain tissue type plasminogen activator)</i>
TLR	<i>(Toll like receptor)</i>
TNF- α	<i>(Tumor necrosis factor-α)</i>
tPA	<i>(Tissue type plasminogen activator)</i>
sc-tPA	<i>(Single chain tissue type plasminogen activator)</i>
SNC	Système nerveux centrale
SPAK	<i>(Ste20-type stress Kinase)</i>

Introduction

2 Les accidents vasculaires cérébraux

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) font référence à un déficit neurologique aigu à la suite d'une défaillance des vaisseaux cérébraux. Les AVC représentent la deuxième cause de mortalité au monde (Gorelick 2019). C'est également l'une des principales causes de morbidité et de handicap acquis chez l'adulte. En France chaque année près de 130 000 personnes sont atteintes d'AVC et environ 30 % d'entre elles décèdent.

Il existe deux types d'AVC. Le premier est de type ischémique, il survient lors de l'apparition d'une restriction du flux sanguin à la suite d'une sténose vasculaire ou d'une occlusion due à l'apparition d'un caillot sanguin. La diminution de l'afflux sanguin au sein du parenchyme cérébral peut provoquer des lésions ischémiques dues au manque d'oxygène et de nutriments. Le deuxième type d'AVC est de type hémorragique. Il apparaît à la suite d'un saignement spontané au niveau des artères cérébrales, ce qui va provoquer une accumulation de sang dans la boîte crânienne, dite hémorragie intracérébrale (ICH). Les AVC hémorragiques ne représentent que 10 à 20 % des AVC (Johnson et al. 2019; Pinho et al. 2019). Cependant, il s'agit de la forme la plus sévère d'AVC, elles sont fatales dans 50 % des cas et peuvent entraîner de graves handicaps (Chemmanam and Davis 2009).

Beaucoup de symptômes sont similaires entre les deux types d'AVC. Cependant, certains signes liés à l'augmentation de la pression intracrânienne sont plus répandus dans les AVC hémorragiques. Ces symptômes comprennent : les vomissements, les maux de tête et dans des cas sévères, le coma. Une des particularités des ICH est l'augmentation progressive des symptômes (dans 60 % des cas)(Chemmanam and Davis 2009). Le diagnostic et l'évaluation rapide et précise de ces pathologies sont donc cruciaux, car les deux types d'accidents vasculaires sont traités de manière opposée. L'imagerie médicale est pour, le diagnostic différentiel, un outil indispensable. Deux examens différents sont le plus souvent utilisés : le PET scan (Tomographie par émission de positrons) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Gross, Jankowitz, and Friedlander 2019).

3 Les accidents vasculaires cérébraux de type hémorragique

Les accidents vasculaires cérébraux de type hémorragique, également appelés les hémorragies intracérébrales spontanées, sont d'origine non traumatique. Les ICH affectent près de 2 millions de personnes par an dans le monde (Bai et al. 2020). Avec un taux très élevé de morbidité et des taux de mortalité d'environ 36,3 % à 1 mois et de 50,7 % à 12 mois (Pinho et al. 2019) et ce à travers le monde (Hemphill et al. 2015). Il n'existe actuellement aucun traitement ayant prouvé une efficacité clinique (Brouwers and Greenberg 2013).

Les hémorragies cérébrales sont une urgence médicale dont le traitement doit être individualisé (Marenco-Hillebrand et al. 2020). Les lignes directrices selon l'AHA « *American Heart Association* » et l'ASA « *American Stroke Association* » (Hemphill et al. 2015), sont en première étape la stabilisation médicale et le monitoring du patient. Il est également nécessaire d'établir rapidement un score clinique évaluant l'état neurologique du patient. Les scores principalement utilisés sont le NIHSS « *score National Institutes of health Stroke Scales* » et le score de Glasgow, GCS « *Glasgow coma scale* ». Il existe également d'autres scores permettant de prédire les conséquences neurologiques de cette pathologie comme le FUNC « *functional outcome in patient with primary intracerebral heamorrhage* » basées sur le volume, la localisation et la présence de saignement dans les ventricules cérébraux. Afin d'établir un diagnostic complet, des examens de neuroimageries sont nécessaires, la référence absolue comme citée plus haut est, pour ce diagnostic, le CT scan sans agent de contraste. Cet examen permet la détermination rapide de la localisation, du volume et les structures cérébrales impliquées. Il permet également l'évaluation du risque d'expansion de l'hématome. D'autres examens peuvent être pratiqués si l'état du patient le permet, comme l'IRM (en écho de gradient ou T2) ou des angiographies, permettant d'établir la cause sous-jacente de l'hémorragie cérébrale. Lorsque le diagnostic est établi, les lignes directrices AHA/ASA recommandent un maintien strict de la pression sanguine avec une pression systolique en dessous de 140mmHg (Hemphill et al. 2015), la correction de toutes coagulopathies sous-jacentes et la prise d'antidote si le patient est sous anticoagulants.

3.1 Différents sous-types d'hémorragies cérébrales

On peut distinguer plusieurs sous-types d'hémorragies en fonction de leur topographie (**Figure 1**). La présentation clinique et la symptomatologie des ICH varient en fonction de leur topographie et des zones cérébrales touchées. On peut distinguer :

- Les hémorragies intraparenchymateuses, lorsque le sang est en contact direct avec le tissu cérébral.
- Les hémorragies sous-arachnoïdiennes, quand l'épanchement sanguin est contenu entre l'arachnoïde et la pie-mère. Elles sont principalement dues (85 % des cas) à la rupture d'un anévrisme intracrânien.
- Les hémorragies intraventriculaires sont la forme la plus rare et la plus sévère de l'ICH. L'hématome se situe dans un ou plusieurs ventricules cérébraux. Les formes primaires d'hémorragies intraventriculaires sont particulièrement rares (2 à 3% des ICH) (Chemmanam and Davis 2009), ce type d'hémorragie se produit le plus souvent suite à l'expansion d'un autre type de l'ICH dans 45% des cas et dans 15% des hémorragies subarachnoïdiennes (Ziai et al. 2014).
- Les hémorragies épidurales : elles se situent entre la dure-mère et le crâne. Elles sont le plus souvent dues à des traumatismes.
- Les hémorragies sous-durales : l'hémorragie se trouve entre les méninges, la dure-mère et l'arachnoïde. Elle se développe le plus fréquemment après des traumatismes.

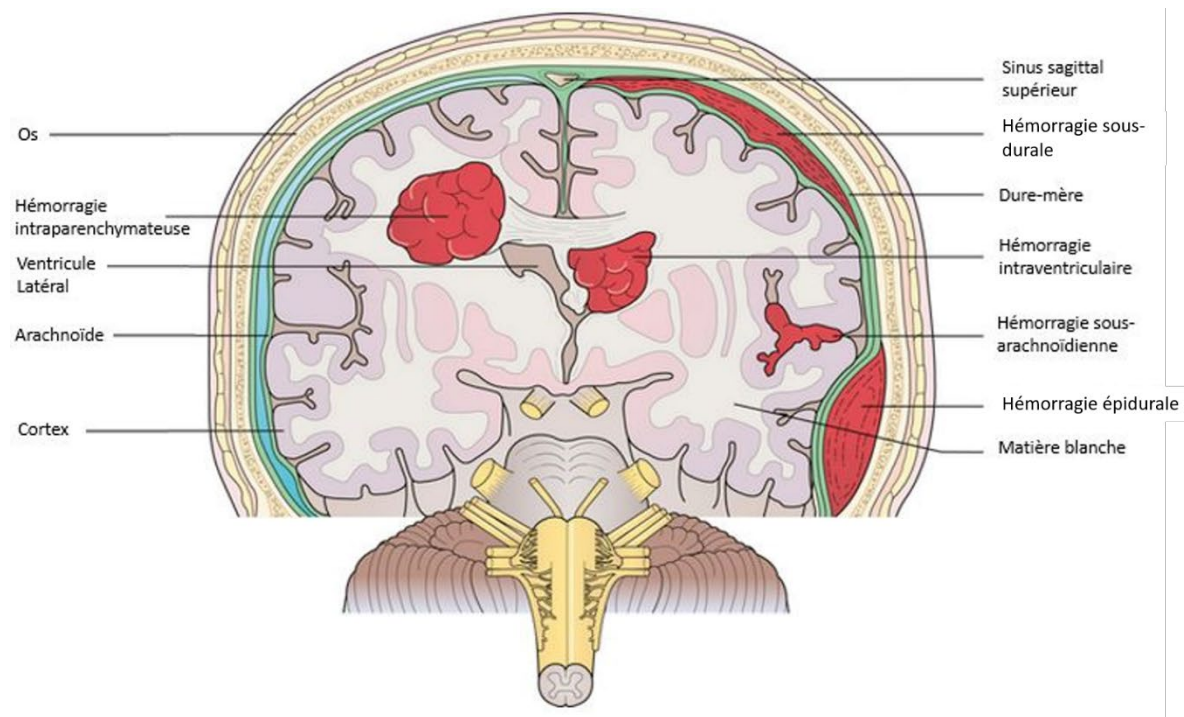


Figure 1: Schéma des topographies des différents sous-types d'hémorragies cérébrales.

Les prochains chapitres sont orientés sur les hémorragies cérébrales spontanées comprenant particulièrement les hémorragies intraparenchymateuses, intraventriculaires et subarachnoïdiennes.

3.2 Étiologie et facteurs de risques des hémorragies cérébrales

On peut distinguer les hémorragies cérébrales en fonction de leurs étiologies (**Figure 2**). Les hémorragies cérébrales primaires sont principalement dues à l'hypertension artérielle (dans 78% à 88% des cas) et en plus faible proportion à des maladies touchant les petits vaisseaux comme les angiopathies cérébrales amyloïdes (ACA). Les hémorragies de type secondaire sont quant à elles dues à une plus grande variété de pathologies. Dont la liste non exhaustive comprend : les coagulopathies, les malformations vasculaires, les anévrismes, les thrombus, les vascularites... (Chemmanam and Davis 2009; Marenco-Hillebrand et al. 2020).

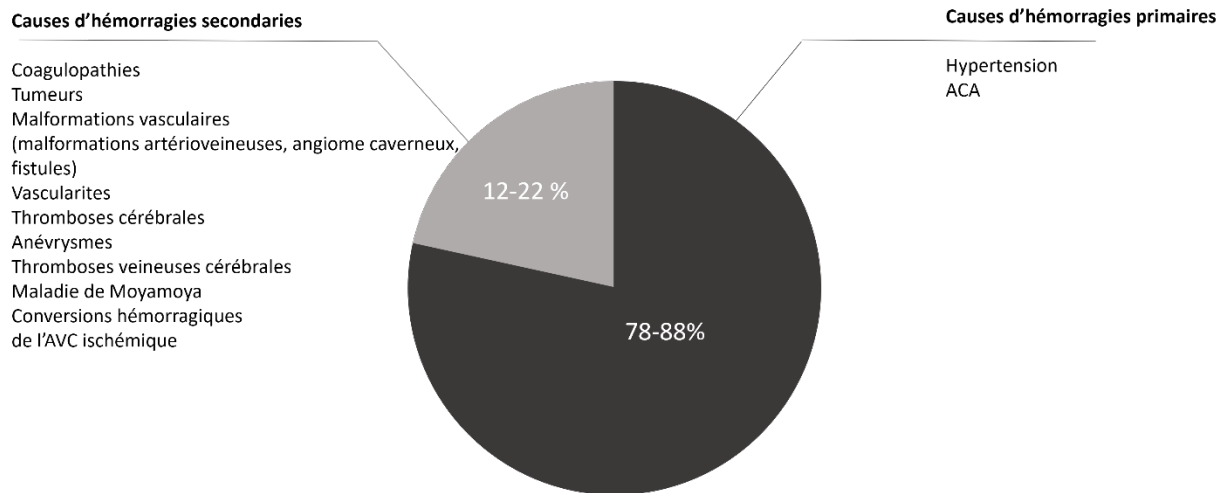


Figure 2: Liste non exhaustive des causes d'hémorragies intracérébrales primaires et secondaires.

Figure adaptée de Marenco-Hillebrand et al. 2020.

3.2.1 Facteurs de risques

Il existe plusieurs facteurs de risques influençant la fréquence des hémorragies cérébrales dans la population générale. Certains de ces facteurs sont modifiables et peuvent être influencés par le mode de vie, d'autres facteurs sont non modifiables comme certaines pathologies et malformations :

Facteurs modifiables :

- L'hypertension : c'est le facteur modifiable le plus important, ce risque est encore plus grand si l'hypertension n'est pas traitée (Woo et al. 2004). L'hypertension chronique est identifiée comme un facteur contribuant à cette pathologie chez 80 à 90 % des patients (Marenco-Hillebrand et al. 2020).
- L'hypocholestérolémie : elle fait partie des facteurs de risques des maladies cardiaques et des AVC ischémiques. Cette condition montre une relation inverse avec les hémorragies cérébrales spontanées. Des études de cohorte montrent un lien entre un faible taux de cholestérol et une hausse de l'incidence des ICH. Ce lien serait

expliqué par l'impact d'un taux de cholestérol faible sur l'agrégation plaquettaire, d'une fragilité vasculaire augmentée en plus de déficiences en nutriment et de maladies sous-jacentes (Chemmanam and Davis 2009; Tirschwell et al. 2004).

- La prise chronique d'anticoagulant et antithrombotique : l'utilisation de la warfarine pour les préventions du risque des AVC ischémiques chez les patients avec une fibrillation auriculaire dans les années 90 a été concomitante à une augmentation du risque d'hémorragies cérébrales chez ces mêmes patients. Démontrant un lien entre la prescription de warfarine et l'incidence des hémorragies cérébrales associées aux anticoagulants (Chemmanam and Davis 2009). Cette augmentation du risque d'ICH due aux anticoagulants et aux antithrombotiques augmenterait avec l'âge, l'historique médical du patient (un AVC ischémique antérieur), l'hypertension ainsi que l'intensité des traitements pris. Cet effet serait également augmenté lorsque les patients prenaient conjointement des traitements antiplaquettaires (Hart, Tonarelli, and Pearce 2005).
- Une forte consommation d'alcool : beaucoup d'études ont mis en évidence l'augmentation du risque d'hémorragie cérébrale et de l'AVC ischémique. Il existe possiblement un lien dose réponse avec la quantité d'alcool consommé chez les grands buveurs, mais cela ne semble pas être le cas chez les buveurs modérés (Ariesen et al. 2003).
- Tabagisme : il a été montré que la consommation actuelle de tabac aurait une influence, mais pas la consommation antérieure. Le tabagisme montre également une dose réponse avec le risque de l'ICH (Feldmann et al. 2005).
- Le diabète : ce facteur est à cheval entre les facteurs modifiables et non modifiables. Car le diabète de type I est une maladie congénitale et fait donc partie des facteurs non modifiables, cependant le diabète de type II est une pathologie acquise impliquant le mode de vie. Les deux types de diabète font partie des facteurs de risques dits mineurs (Ariesen et al. 2003).

Facteurs non modifiables :

- L'âge : il a été montré que l'incidence des hémorragies intracérébrales augmente avec l'âge (van Asch et al. 2010).
- L'angioplastie amyloïde cérébrale : c'est une cause importante d'hémorragie lobaire chez les personnes âgées. Cette pathologie impacte la musculature vasculaire par des dépôts d'amyloïde dans la media et l'adventice des artères, artérioles et capillaires leptoméningés (Chemmanam and Davis 2009). Il en suit la formation d'anévrisme miliaires (anévrisme de petite taille) (Chemmanam and Davis 2009). Ces anévrismes peuvent ensuite, se rompre et engendrer une hémorragie (Ziai et al. 2012).
- Infarctus cérébraux : les patients ayant eu un infarctus cérébral présentent un risque entre 5 et 22 fois plus grand de développer une hémorragie cérébrale (Woo et al. 2002).
- Les anévrismes et les malformations vasculaires : la rupture des anévrismes vasculaires est une cause d'hémorragies cérébrales. Majoritairement responsables des hémorragies subarachnoïdiennes, ils peuvent occasionnellement engendrer un saignement dans le parenchyme et provoquer des hémorragies intracérébrales (R. D. J. Brown et al. 2005).

4 Les hémorragies intracérébrales parenchymateuses

Les hémorragies parenchymateuses sont le type le plus fréquent d'hémorragies spontanées. Elles vont principalement toucher les lobes cérébraux, les ganglions gris, le thalamus, le tronc cérébral (plus fréquemment le pont) et le cervelet (Qureshi, Mendelow, and Hanley 2009). La présentation clinique de ce type d'hémorragies varie énormément en fonction de la localisation de ces dernières. Comme expliqué plus haut, une partie des symptômes, indépendamment de la localisation, est due à la compression du tissu cérébral. Ils comprennent : les maux des têtes, les vomissements, l'aggravation des déficits neurologiques et parfois le coma. Il est également possible que des crises d'épilepsie apparaissent. Ce dernier symptôme varie en fonction des zones du cerveau touchées. Elles sont plus fréquentes dans les hémorragies lobaires et particulièrement du lobe frontal (De Reuck, Hemelsoet, and Van Maele 2007).

La physiopathologie des ICH repose sur les lésions provoquées par la présence de sang dans le parenchyme. Ces lésions peuvent être distinguées en deux types, la lésion primaire, due à l'effet de masse provoqué par la compression du tissu cérébral. En effet, il a été démontré que les hématomes cérébraux modifient le gradient de pression entre le tissu autour de la lésion et le tissu distant ce qui peut impacter la perfusion cérébrale et affecter la viabilité du parenchyme environnant la lésion. Cette lésion arrive pendant les premières minutes et heures après le début de l'hémorragie (Chambers et al. 2009; Qureshi, Mendelow, and Hanley 2009). Les régions du parenchyme avoisinant l'hématome sont caractérisées par la présence d'œdème, d'apoptose et de nécrose cellulaires ainsi que par l'invasion du tissu par des cellules inflammatoires. L'œdème se développe rapidement après le début de l'hémorragie et contribue à l'effet de masse et l'augmentation de la pression intracrânienne. Il est associé à un taux plus élevé de mortalité. Il peut croître jusqu'à 10 jours après le début de l'hémorragie (Staykov et al. 2011). L'hématome va également induire des lésions mécaniques aux neurones et à la glie (Qureshi et al. 2001), suivies par la déformation de ces cellules, ainsi que le relargage de neurotransmetteurs, la dysfonction des mitochondries et la dépolarisation de la membrane (Lusardi et al. 2004; Qureshi et al. 2003). Selon la sévérité de ces dysfonctionnements, cela peut engendrer une mise en veille transitoire du métabolisme ou une nécrose. L'hypoperfusion locale semble être secondaire à la baisse du métabolisme

(Qureshi et al. 1999). Cependant, en présence d'une forte pression intracrânienne et une diminution de la pression de perfusion cérébrale, le risque d'ischémie global augmente (Qureshi, Mendelow, and Hanley 2009).

La lésion secondaire est due à la présence des dérivés cytotoxiques du sang (Aronowski and Zhao 2011). Les composants du sang (principalement les érythrocytes et les protéines plasmatiques), les molécules résiduelles de la mort cellulaire comme les acides nucléiques, les composants extracellulaires (fibres de collagènes, protéoglycanes et autres protéines), l'adénosine triphosphate (ATP) et l'acide urique engendrent un environnement très cytotoxique pro-oxydatif et pro-inflammatoire, ce dès le début de l'hémorragie. L'activation des processus hémostatiques en réponse au saignement engendre la sécrétion de thrombine pour stopper le saignement. La présence de thrombine est indispensable à la coagulation et elle est activée dans les premières heures de l'ICH (Gong et al. 2008). De plus, la lyse des érythrocytes commence environ 24h après le début de l'hémorragie et continue plusieurs jours après. Cette lyse libère de l'hémoglobine. L'hémoglobine et ses produits de destructions (l'hème et le fer) sont très cytotoxiques et provoquent la formation de radicaux libres ainsi qu'un stress oxydatif massif (Wagner et al. 2003). La production de radicaux libres due au fer se fait par la réaction de Fenton (Jimin Wu et al. 2003). Cet environnement va activer la microglie dans les 4h suivant le début de l'hémorragie (Nakamura et al. 2005). Cette activation se fait *via* les récepteurs *Toll-Like* (TLRs), comme le récepteur TLR-4 (Fang et al. 2013; Taylor and Sansing 2013). Ce récepteur va être surexprimé dans les ICH. La microglie activée va relarguer des facteurs pro-inflammatoires qui participent aux recrutements de cellules inflammatoires sur le site de lésion comme le facteur de nécrose tissulaire (TNF- α) et l'interleukine-1 β (IL-1 β) (J. Wang and Doré 2007a). Les premières cellules inflammatoires sont les neutrophiles (18h à 4 jours), puis les macrophages vont infiltrer le tissu (1 jour à des mois après l'hémorragie) (Aronowski and Hall 2013; J. Wang and Doré 2007b). La majorité de ces voies de signalisation inflammatoires sont coordonnées par le facteur de transcription NF- κ B (Baeuerle and Henkel 1994) qui cible des gènes divers codant pour des cytokines, chimiokines, métalloprotéinases, *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), cyclooxygénase 2 (COX2), récepteurs immunitaires et des protéines de la phase aiguë de la réponse inflammatoire. Ce facteur de transcription peut être activé par des radicaux libres, les composants du sang, la thrombine, la fibrine et l'hème (Loftspring, Hansen, and Clark 2010;

Y.-C. Wang et al. 2014). Des Études ont montré que le NF- κ B est activé dans les 15 min après la survenue d'ICH jusqu'à maximum 1 à 3 jours après le début de l'ICH, il va par la suite rester élevé pendant les semaines suivantes (Zhao et al. 2007)

L'environnement ischémique cumulé à la présence de l'hémoglobine, du fer, de l'augmentation des cellules inflammatoires, des cytokines et de la migration trans endothéliale des leucocytes va participer à l'ouverture et la destruction de la barrière hématoencéphalique (BHE) (Aronowski and Zhao 2011; J. Wang and Doré 2007b; Yang et al. 2013) Un phénomène qui est augmenté par la présence de Métalloprotéase (MMP), responsable du remodelage de la matrice extracellulaire, mais qui en condition pathologique peut augmenter le dysfonctionnement de la BHE (Rosenberg and Navratil 1997).

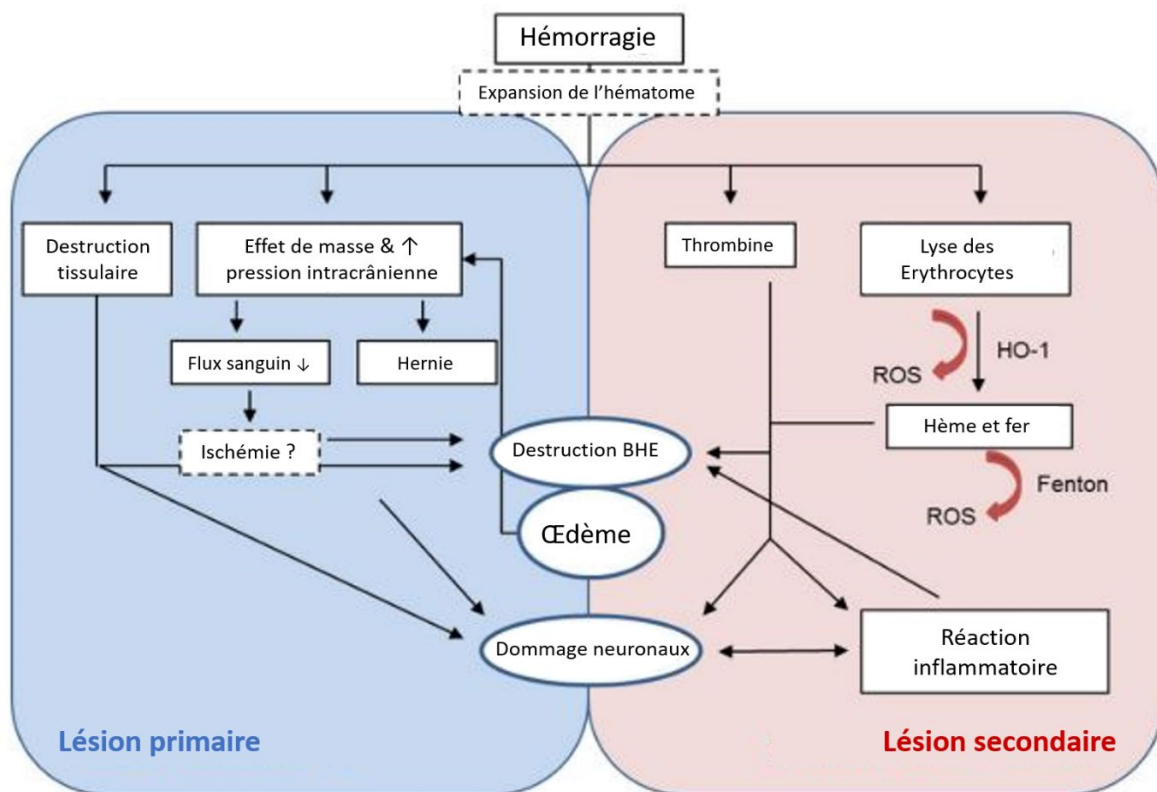


Figure 3 : Représentation schématique de la lésion primaire et secondaire après une hémorragie intracérébrale.

Figure adaptée de Mracsko and Veltkamp 2014.

Ces deux types de lésions sont impliquées dans la sévérité de la pathologie et sont donc des cibles potentielles pour le développement de traitement visant à l'amélioration du devenir du patient (voir [chapitre 5](#)).

5 Hémorragie intraventriculaire

Les hémorragies intraventriculaires se produisent lorsqu'un épanchement sanguin survient dans le système ventriculaire cérébral.

Les hémorragies intraventriculaires (IVH) primaires sont très rares chez l'adulte, elles représentent 2 à 3 % des admissions pour IVH (Martí-Fàbregas et al. 1999). Les complications majeures des hémorragies intraventriculaires sont l'élévation de la pression intracrânienne et le développement d'hydrocéphalie. Ces complications peuvent être fatales. Les patients développant une IVH sont le plus souvent hypertendus, avec des coagulopathies, ainsi que des malformations vasculaires (Chemmanam and Davis 2009). Les hémorragies intraventriculaires secondaires chez les adultes sont le plus souvent dues à une extension d'une hémorragie intracérébrale. Une extension intraventriculaire est chez 50 % des patients, un prédicteur de la sévérité de la pathologie (Qureshi, Mendelow, and Hanley 2009).

Trois impacts physiques immédiats de l'IVH peuvent être cités : le premier est le déplacement de tissus cérébraux, cela peut créer une perte de cellules épendymaires recouvrant les parois des ventricules (Cherian et al. 2003). Cependant, les conséquences de l'expansion des ventricules ne sont pas encore claires (Garton et al. 2017). La seconde conséquence physique des IVH est l'augmentation de la pression intracrânienne, cela va impacter la perfusion cérébrale et peut causer des hernies du tissu cérébral. Le dernier effet physique est le blocage de la circulation du liquide céphalorachidien (LCR) (Aquilina, Chakkarapani, and Thoresen 2012). Ce blocage peut avoir lieu au niveau de la communication entre les ventricules ou aux sites de son écoulement. Cela peut engendrer une hydrocéphalie posthémorragique (HPH). Il a également été démontré que la sécrétion du LCR augmente après une hémorragie, ce qui *via* le récepteur TLR-4 va activer la Ste20-type stress kinase (SPAK). Cette dernière phosphoryle par la suite et active le cotransporteur au Na/K/Cl (NKCC-1) à la surface apicale des cellules épithéliales des plexus choroïdes. La correction du déséquilibre entre la sécrétion et l'écoulement du LCR est une cible thérapeutique pour le traitement de l'HPH (Garton et al. 2017).

Les lésions dues à l'effet de masse et à la toxicité des composés du sang sont également présentes dans les IVH. Dans les ventricules, l'hémoglobine produit une réponse inflammatoire caractérisée par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α)

dans le LCR. Les régions du parenchyme périventriculaire vont également être touchées. En effet, due aux lésions subies par les cellules épendymaires (l'effet de masse et la présence de composés du sang cytotoxique) il est possible que cela crée des zones sans ces dernières (Gao et al. 2014), permettant le passage de l'hémoglobine dans le parenchyme cérébral. La présence de l'hémoglobine dans les ventricules peut impacter des régions cérébrales plus distantes comme l'hippocampe, dans laquelle une neurodégénération liée au récepteur c-Jun N-terminal kinase (JNK) est visible jusqu'à 3 jours après (Garton et al. 2016). La présence d'hémoglobine dans le LCR peut également induire une HPH (Strahle et al. 2014). Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas bien connus. Il est possible que cela se produise également par une activation du récepteur TLR-4 sur l'épithélium des plexus choroïdes *via* le cotransporteur NKCC-1 (Karimy et al. 2017). Le TLR-4 peut être activé par la méthémoglobine, l'hème et les produits de dégradation de l'hémoglobine. De plus, il a été démontré que l'hémoglobine intraventriculaire peut influencer l'expression des aquaporines. Les aquaporines sont importantes pour la production et la circulation du LCR (Ríos et al. 2019).

Ainsi les mécanismes impliqués dans les lésions primaires et secondaires des hémorragies sont d'importantes cibles thérapeutiques comme abordé dans le chapitre suivant.

6 Essais cliniques et perspectives de traitements

Comme expliqué précédemment il n'existe pas de consensus actuel sur un traitement unique des hémorragies intracérébrales, mais des lignes directrices pour la stabilisation du patient avec si le cas le demande certaines interventions très invasives pour le maintien de la pression intracrânienne (Gross, Jankowitz, and Friedlander 2019). La chirurgie (craniotomie conventionnelle) est recommandée seulement dans les cas suivants : le patient montre une aggravation clinique, des hémorragies au niveau du cervelet, une compression du tronc cérébral ou une obstruction ventriculaire pouvant entraîner une hydrocéphalie. Cependant, chez les patients avec une hémorragie supratentorielle elle reste controversée (Marenco-Hillebrand et al. 2020).

Le traitement des hémorragies intracérébrales et intraventriculaires est donc le sujet de beaucoup d'études. Plusieurs stratégies pour améliorer le devenir des patients sont étudiées. L'une d'entre elles est basée sur la neuroprotection. Ce type d'approche cible des mécanismes impliqués dans les lésions tissulaires résultant de l'hémorragie.

Le premier mécanisme ciblé a été la coagulation, afin de limiter l'expansion de l'hématome le plus tôt possible pour diminuer l'effet de masse de ce dernier et la lésion primaire qu'il engendre.

Les études cliniques FAST (rFVIIa for Acute Hemorrhagic Stroke Administered at Earliest Time) visaient à étudier l'efficacité du facteur VIIa recombinant pouvant réduire le volume des hémorragies intracérébrales (Emlet and Crippen 2006). Le traitement se fait dans les 3h après le début des symptômes. Ce facteur est une protéine de la cascade de la coagulation, le facteur VII activé recombinant est utilisé pour prévenir les saignements chez les personnes atteintes d'hémophilie. L'étude FAST de phase II a montré une réduction de la croissance de l'hématome et une amélioration de l'issue clinique ainsi qu'une baisse de la mortalité. Cependant, l'étude de phase III n'a pas montré de bénéfice clinique (Emlet and Crippen 2006).

La desmopressine (DDAVP), est un analogue synthétique de la vasopressine (hormone diurétique) (Lethagen 1997), elle réduit le temps de saignement sans augmenter le tonus vasculaire contrairement à la vasopressine (Balduini et al. 1999). La desmopressine améliore

la fonction des plaquettes en facilitant le relargage du facteur VIII. Elle est également utilisée pour traiter les atteintes du facteur de von Willbrand (de la Fuente et al. 1985). L'étude clinique IMPACT (The Improving Platelet Activity for Cerebral Treatment - DDAVP Proof of Concept) a montré que la desmopressine est bien tolérée et améliore l'activité des plaquettes dans les hémorragies cérébrales aiguës. Une étude de phase II pour étudier l'impact de la DDAVP sur le volume de l'hématome a été planifiée (Naidech et al. 2014).

Un autre composant étudié est le conivaptan, il s'agit d'un antagoniste du récepteur à la vasopressine. Il pourrait être utilisé dans les hémorragies subarachnoïdiennes pour corriger le déséquilibre en électrolytes dans le cas d'hémorragies subarachnoïdiennes dues à une rupture d'anévrisme (Annane, Decaux, and Smith 2009; Walcott, Kahle, and Simard 2012). L'inhibition du récepteur à vasopressine a généralement pour effet d'augmenter la diurèse et de réduire le volume vasculaire et la pression sanguine. Une étude clinique a été faite sur un petit nombre de patients avec une ICH pour tester la sécurité de l'administration du conivaptan. Cette étude a donné des résultats prometteurs (Corry et al. 2020).

L'acide tranexamique, il s'agit d'un dérivé de la lysine, il fonctionne comme un antifibrinolytique réversible inhibant la conversion du plasminogène en plasmine. Une étude pilote a testé la sécurité de l'acide tranexamique dans les ICH (Sprigg et al. 2014). Cette étude n'a pas montré de différence sur la mortalité entre les patients ayant reçu l'acide tranexamique et les patients ayant reçu le placebo. Une seconde étude a été conduite (Ananda, R, and Casilda 2015). Elle a permis de démontrer une réduction du volume de l'hémorragie chez les patients ayant reçu de l'acide tranexamique et a été continuée par une étude de phase III TRANSACT « Treatment of Intracerebral Hemorrhage in Patients on Non-vitamin K Antagonist » en cours d'exécution.

Acide ϵ -Aminocaproïque, il s'agit d'un acide aminé qui inhibe les sites de liaison de la lysine sur le plasminogène. Cela prévient la liaison du plasminogène à la fibrine et réduit le catabolisme de cette dernière, il va donc stabiliser le caillot de fibrine. Une étude pilote a été conduite sur l'administration de l'acide ϵ -Aminocaproïque dans les 3h après le début des symptômes (Piriyawat et al. 2004). Malheureusement cette étude pilote n'a pas montré de réduction de l'expansion de l'hématome.

En suivant la même stratégie de neuroprotection, une autre méthode a été investiguée, visant cette fois-ci les acteurs de la lésion secondaire comme les dérivés de l'hémoglobine. La déféroxamine est un agent chélateur du fer. Normalement utilisé dans les pathologies liées à une surdose en fer. Plusieurs études s'intéressent à sa capacité neuroprotectrice, car elle peut prévenir la génération de radicaux libres dans le cerveau suite aux ICH (Hua et al. 2008; Wan et al. 2006). Une étude clinique de phase I a permis de montrer la sécurité de son administration sur 3 jours après le début de l'hémorragie (Selim et al. 2011). Par la suite une étude de phase II conduite en Chine a montré qu'une dose de 62mg/kg/jour de déféroxamine administrée pendant 3 jours après l'ICH pourrait réduire l'œdème en décollant (Yu et al. 2015). Cette étude a également montré que la déféroxamine peut diminuer la résorption de l'hématome. Cependant, une seconde étude de phase II conduite aux États-Unis, en utilisant le même dosage, a montré une augmentation de l'incidence des syndromes de détresse respiratoire. De ce fait, cette étude a été arrêtée et reconduite en utilisant une dose plus faible de déféroxamine (Yeatts et al. 2013).

Un autre chélateur du fer est en cours d'étude. La minocycline. C'est un dérivé de la tétracycline 60. Son effet chélateur serait plus fort que celui de la déféroxamine. Cette molécule a montré des résultats prometteurs *in vivo* (Wasserman and Schlichter 2007; J Wu et al. 2010). Une étude préliminaire chez l'Homme a permis de monter sa sécurité (Fouda et al. 2017).

L'inflammation est également un acteur non négligeable des lésions primaires et secondaires et une cible potentielle pour les stratégies de neuroprotection. Le celecoxib est un inhibiteur sélectif de la COX2. Son inhibition permettrait de diminuer l'œdème cérébral et la neuroinflammation. L'administration de celecoxib pendant 7 jours semble diminuer l'hématome ainsi que l'œdème en résultant (Lee et al. 2013). De plus, son administration durant 14 jours diminuerait l'œdème peri-hématomal (H. K. Park et al. 2009).

Malgré les résultats prometteurs de certaines de ces études, l'utilisation de techniques neuroprotectrices seules ne semble pas améliorer suffisamment le devenir des patients. Elles peuvent donc être imaginées comme complément d'une approche chirurgicale d'évacuation de l'hématome. Le besoin de développement de nouvelles techniques chirurgicales prend donc un nouveau sens.

En parallèle de ces approches neuroprotectrices, des techniques de chirurgie moins invasives et pouvant être utilisées dans des indications plus étendues que la craniotomie conventionnelle ont commencé à émerger.

Les techniques dites *minimally invasive* (MI) visent à réduire la morbidité liée à la procédure chirurgicale en diminuant les lésions provoquées au parenchyme cérébral lors de la chirurgie. Ces méthodes reposent sur des endoporteurs ou des rétracteurs tubulaires et des instruments de petits diamètres combinés avec des techniques comme la neuro-endoscopie traditionnelle. On peut classer ces méthodes selon l'utilisation de stéréotaxie et de produits pharmacologiques ou en méthodes mécaniques. Les méthodes utilisant la stéréotaxie et l'utilisation de produits pharmacologiques reposent sur le placement d'un cathéter à l'intérieur de la cavité hémorragique pour l'administration d'un agent thrombolytique et le drainage de l'hématome. Les méthodes mécaniques reposent quant à elles sur l'évacuation de l'hématome sans thrombolyse au préalable et en une seule procédure plutôt que sur le drainage passif de l'hématome sur plusieurs jours.

On peut citer comme exemple de l'approche mécanique :

L'évacuation de l'hématome par endoscopie, elle a été étudiée par Auer et al. 1989. Cette dernière montre un risque plus faible chez les patients de moins de 60 ans et avec des hématomes sous-corticaux. Cependant, cette étude n'a pas réussi à montrer une amélioration fonctionnelle (Auer et al. 1989; Marenco-Hillebrand et al. 2020).

Le BrainPath, un dispositif de rétraction tubulaire. Ce dispositif est composé d'une gaine transparente et d'un obturateur. Il permet une rétraction circonférentielle qui distribue les forces sur le parenchyme cérébral. Une étude multicentrique de phase II a montré une diminution du volume de l'hématome entre 50 et 89 % avec une amélioration significative du GCS médian. Le suivi des patients entre 30 jours et 1 an n'a montré aucune mortalité. De plus, la majorité des patients ont obtenu un score MRS inférieur à 2 avec une grande amélioration de l'indépendance fonctionnelle (Labib et al. 2017).



Figure 4: Système BrainPath®.

Ce système inclut des produits allant de 11mm de diamètre à 13,5mm avec diverses longueurs adaptées aux besoins chirurgicaux. Image importée depuis : www.niconuero.com

Le système Artemis™ anciennement Apollo : Est un système composé d'un long tube permettant une aspiration et une irrigation. Il contient également des éléments pouvant vibrer pour éliminer la formation des caillots sanguins dans le tube. Il est également adaptable aux endoscopes déjà existants. Ce système a montré, dans une étude multicentrique, une diminution du volume de l'hémorragie d'un peu plus de 50 % avec une diminution du taux de mortalité de près de 14% (Spiotta et al. 2015).



Figure 5 : Système Artemis™.

Le système Artemis™ est représenté ici avec la Pump Max™ Image importée depuis : www.penumbrainc.com

L'approche parafaculaire : Cette technique utilise les passages anatomiques déjà existants pour permettre l'évacuation du caillot en causant le moins de lésions possible. Elle est faite

grâce à des rétracteurs tubulaires (comme le BrainPath™) qui sont introduits à l'aide de système de neuronavigation (Ritsma et al. 2014).

L'évacuation mécanique de l'hématome est avantageuse, car elle permet l'évacuation immédiate du sang, la réduction de l'effet de masse et peut diminuer le temps d'hospitalisation. Cependant, les bénéfices sur les issues fonctionnelles de ces techniques ne sont pas encore clairs. Trois études cliniques sont en cours de réalisation et visent à répondre à ces questions : ENRICH ; un essai clinique de phase II pour la pratique précoce de chirurgie dite «*minimally invasive*», l'étude INVEST : compare le système Artemis™ et la stabilisation médicale pour des hémorragies supratentorielles dans des hémorragies de grand volume, et une troisième étude, l'étude MIND ; une étude clinique à grande échelle évaluant également le système Artemis™ de neuroévacuation.

Les méthodes reposant sur une approche stéréotaxique et pharmacologique ont été étudiées avec principalement deux thrombolytiques : l'urokinase et l'activateur tissulaire du plasminogène.

L'utilisation d'un thrombolytique et d'une approche *minimally invasive* (MI) a été initialement testée avec une craniopuncture MI et une aspiration à la suite d'une administration d'urokinase durant 3 à 5 jours. Malgré une tendance favorable, et une diminution de la dépendance chez le groupe ayant reçu la chirurgie, la mortalité à 90 jours n'était pas significativement différente entre le groupe ayant bénéficié d'un management de conservatif et l'intervention (W. Z. Wang et al. 2009). Dans une autre étude comparant cette fois une craniotomie à une craniopuncture MI et une aspiration à la suite de l'administration d'urokinase, les patients ayant reçu le thrombolytique ont montré une amélioration fonctionnelle. Malgré cela aucune différence significative n'a été rapportée dans les deux groupes (Sun et al. 2010).

Un second essai clinique a été fait avec une chirurgie dite *minimally invasive surgery* (MIS) combiné à l'injection d'altéplase® (activateur tissulaire du plasminogène recombinant). Cette étude multicentrique de phase II avait pour but d'évaluer l'efficacité et la sécurité de l'altéplase® combinée avec une MIS. Cette étude (MISTIE, *Minimally Invasive Surgery Plus rt-PA for ICH Evacuation*) a montré une réduction significative de l'hématome observée chez les patients traités en comparaison aux patients stabilisés. Cependant, la mortalité dans les deux groupes n'était pas différente à 7 et 30 jours. De plus, une augmentation du risque

d'hémorragies asymptomatiques a été observée 72h après la procédure (Hanley et al. 2016). Dans l'étude de phase III, l'analyse approfondie des données a montré un lien entre la chirurgie et l'amélioration fonctionnelle des patients (Awad et al. 2019 ; Hanley et al. 2019). Bien que cette étude ait montré une réduction de la mortalité à 1 an chez les personnes avant une petite hémorragie résiduelle < 15ml, chez les patients avec un volume d'hémorragie plus grand (volume médian 41,8 ml) la thrombolyse combinée à une MIS n'as pas amélioré l'issue fonctionnelle à 1 an.

Dans le cas des hémorragies intraventriculaires, les techniques MIS et la thrombolyse ont également été testées (Naff et al. 2011). L'étude CLEAR III a démontré l'efficacité et la sécurité de l'utilisation de l'altéplase® intraventriculaire (Hanley et al. 2017). Une diminution de la mortalité à 180 jours a également été démontrée. Des analyses supplémentaires ont permis de montrer que les patients avec un volume de > 20 cm³ présentaient des scores finaux MRS entre 0 et 3 (Hanley et al. 2017).

Les MIS ont donc montré des bénéfices pour la diminution des lésions provoquées au tissu cérébral viable. De plus, couplées à la thrombolyse elles ont montré des résultats prometteurs pour l'amélioration clinique du patient.



Figure 6: Exemple de cathéters ventriculaires.

Ces cathéters sont utilisés pour l'injection de thrombolytique et l'aspiration du sang lysée lors des chirurgies *minimally invasive*. Image prise depuis : www.sophysa.com

7 Les anévrismes généralités

L'anévrisme est une maladie touchant la paroi des vaisseaux sanguins. La paroi vasculaire va montrer une dilatation locale et irréversible. Elle est observée après un changement morphologique au niveau endoluminal des vaisseaux (Chemmanam and Davis 2009; McGloughlin 2011). Les anévrismes touchent principalement le système artériel, même si dans de rares cas ils peuvent survenir sur certaines veines (Gillet 2015).

7.1 Les différents types d'anévrismes

On distingue deux types d'anévrismes en fonction de l'aire vasculaire touchée. Dans le premier type, le type fusiforme, toute la circonférence vasculaire est impactée. L'anévrisme forme donc une boursoufflure localisée sur tout le diamètre du vaisseau. Ce type d'anévrisme touche principalement les artères musculaires élastiques de la périphérie comme l'aorte. Le deuxième type, dit sacculaire, dans lequel seulement une petite partie de la circonférence de la paroi vasculaire est touchée, l'anévrisme prendra la forme d'un sac. Le type sacculaire touche principalement les artères cérébrales (Lasheras 2007) (**Figure 7**). Ce type d'anévrisme se trouve principalement à l'apex des bifurcations vasculaires, aux branchements de petites artères ou sur la paroi des artères anguleuses (Etminan et al. 2015; Lasheras 2007).

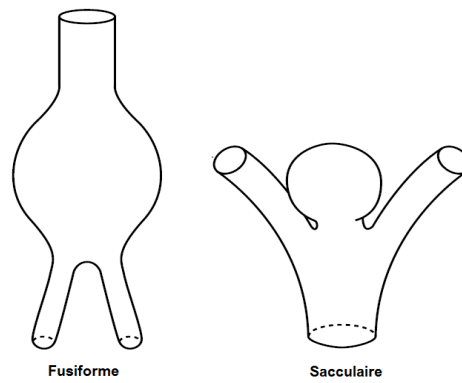


Figure 7: Schéma des deux différents types d'anévrismes pouvant être décrits.

Le type fusiforme : l'anévrisme est sur tout le diamètre du vaisseau, il est plus fréquent dans la périphérie. Le type sacculaire : est un renflement sur une petite partie de l'artère, la paroi distendue va former un sac, il est plus fréquent dans les vaisseaux cérébraux.

8 L'anévrisme intracrânien

Les anévrismes intracrâniens (AI) ont une prévalence de 3 à 5 % dans la population générale adulte (Etminan et al. 2015). Ce type d'anévrisme touche les artères principales de la circulation cérébrale, comme du cercle de Willis et particulièrement les artéριοles de l'espace sous-arachnoïdien (il s'agit de l'espace entre les deux méninges, l'arachnoïde et la pie-mère, cet espace est occupé par le tissu trabéculaire sous-arachnoïdien et les vaisseaux cérébraux (**Figure 8**). Dans la majorité des cas, les anévrismes intracrâniens sont asymptomatiques. L'augmentation de leur diagnostic ces deux dernières décennies est concomitante à l'amélioration des techniques d'imagerie et à leurs pratiques plus fréquentes (Labeyrie et al. 2017; Lasheras 2007). Le taux de létalité d'une hémorragie sous-arachnoïdienne due à la rupture d'un anévrisme reste entre 25 et 50%. Les pronostics sont d'autant plus faibles qu'il est très difficile de prévoir la croissance et la rupture des anévrismes. Les anévrismes sont rarement identifiés chez les enfants et leur prévalence augmente avec l'âge (Inagawa and Hirano 1990; Stehbens 1989).

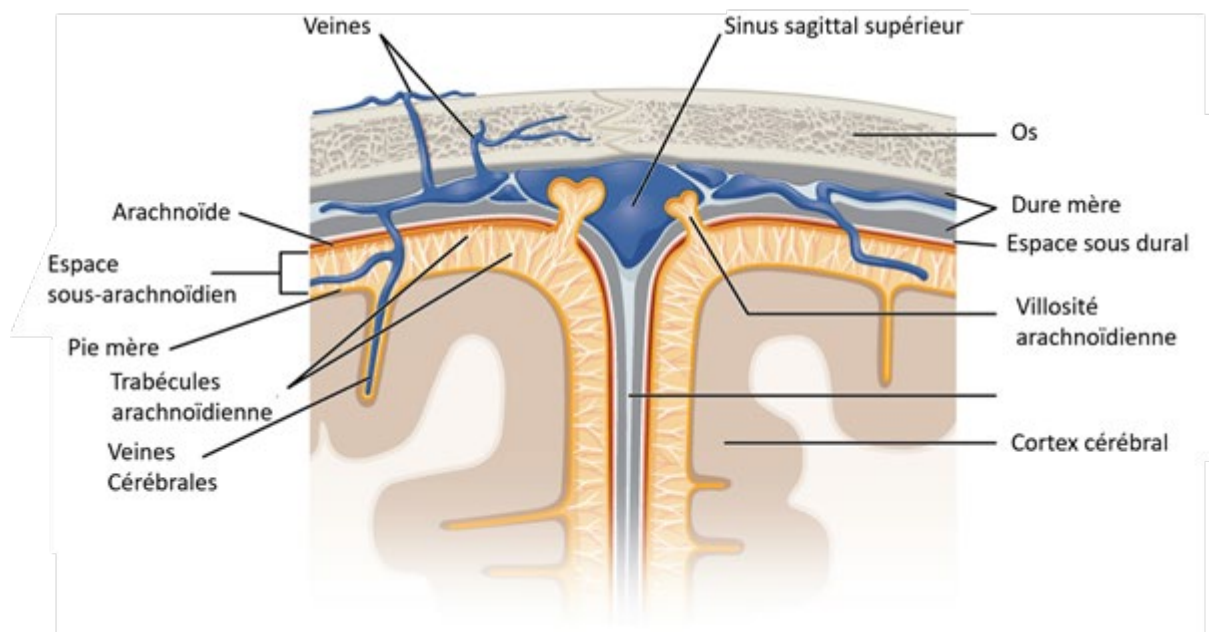


Figure 8 : Représentation schématique des différentes méninges et de leurs espaces

(Image importée de Wikimedia commons)

8.1 Les particularités des vaisseaux intracrâniens

Il est important de noter que les vaisseaux intracrâniens possèdent une structure et une élasticité légèrement différentes des autres vaisseaux du corps. Dans des conditions physiologiques, ils sont composés de 3 couches : l'intima, la media et adventice. L'intima est la couche la plus interne avec une membrane basale et des cellules endothéliales. La media est constituée de cellules musculaires lisses organisées de manière concentrique, elles sont entourées d'un dense réseau de fibres de collagène et d'élastine, ces dernières permettent leur compliance. L'adventice est la couche la plus externe, elle est principalement faite de collagène, ce qui permet de garantir l'intégrité structurelle du vaisseau. Entre l'intima et la media se trouve une lame élastique interne, une structure clé dans la formation des anévrismes, lorsqu'elle est dégradée cela peut conduire à des changements au niveau structurel et par conséquent former un anévrisme. Contrairement aux vaisseaux de la périphérie, les artères cérébrales ne possèdent pas de lame élastique externe, mais seulement une lame élastique interne plus épaisse ainsi qu'une média et une adventice contenant une plus faible quantité de fibres élastiques et de cellules musculaires lisses. La quantité de tissu conjonctif entourant les vaisseaux est significativement plus faible dans l'espace subarachnoïdien, la composition cellulaire de l'adventice va également changer lorsque les artères se trouvent dans cet espace et contenir des cellules leptoméningées. (Etminan et al. 2015; Lasheras 2007; Pereira et al. 2013). De plus, sur une grande partie de leur trajet, les artères cérébrales circulent dans du liquide (le liquide céphalorachidien). Elles ne sont donc pas contenues par du tissu comme les autres artères de l'organisme (Lindholt 2006). Ce manque de renforcement externe additionné à leur composition élastique différente rend ces artères particulièrement vulnérables et plus susceptibles de développer des anévrismes.

8.2 Mécanismes de formation des anévrismes intracrâniens

Tout d'abord, il est important de préciser que les mécanismes exacts de la formation, de la croissance et de la rupture des anévrismes ne sont pas encore connus. Cependant, il existe un consensus sur certains d'entre eux.

Dans l'anévrisme intracrânien, la paroi vasculaire n'est pas homogène. La couche endothéliale de la paroi est touchée. La média est affinée et les cellules musculaires lisses sont de plus en plus rares dues à une apoptose marquée ainsi qu'une inhibition de leur prolifération. Ces mécanismes de remodelage sont liés à un environnement hémodynamique complexe associé aux particularités morphologiques de ces vaisseaux. L'impact de ces conditions hémodynamiques se manifeste principalement sur l'apex de la bifurcation des vaisseaux où l'absence d'une couche musculaire rend la paroi vasculaire particulièrement vulnérable. L'association entre un gradient positif de ces contraintes de cisaillement et d'une vitesse d'écoulement plus faible favorise la stagnation des éléments du sang dans cette région ce qui augmente l'adhésion des plaquettes et des monocytes aux cellules endothéliales (Hashimoto, Meng, and Young 2006; Vega, Kwoon, and Lavine 2002). Les contraintes de cisaillement sur la paroi vont induire une modification de l'expression génétique des cellules endothéliales, pour devenir pro-inflammatoire, et exprimer différents facteurs comme : E-selectine, P-selectine, VCAM-1, MCP-1, ICAM-1, TNF- α , IL- β , IL-6 ce qui conduit au recrutement de cellules de l'inflammation comme les macrophages, les cellules T, les cellules dites *natural killer* (NK) et les neutrophiles. Cette modification est un élément clé dans la cascade d'évènements menant à d'autres pathologies vasculaires liées à une inflammation tel que l'athérosclérose et les sténoses (Hashimoto, Meng, and Young 2006). Cela se fait probablement en parallèle à des modifications au niveau des cellules musculaires vasculaires lisses (CMVL) dans la média. Les CMVL répondent à des stimuli environnementaux *via* des signaux provoquant l'expression de cellules pro-inflammatoires, pro-remodelages et induisant une dédifférenciation de leur phénotype (Fennell et al. 2016). Les cellules changent de morphologie puis migrent dans la média créant une hyperplasie myo-intimal. L'accumulation de facteur hémodynamique et la sécrétion de facteur pro inflammatoire (TNF- α , IL- β , dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), monoxyde d'azote (NO), facteur de croissance (GF), métalloprotéinases 1,2 et 9,... voir [Figure 9](#)) (Etminan et al. 2015; Hashimoto, Meng, and Young 2006; Lasheras 2007; McGloughlin 2011) engendrent un phénotype de CMVL pro-inflammatoire qui peut se

caractériser par la diminution d'éléments contractiles (*via* la diminution des chaînes lourdes de myosine, α -actine et de semicarbazide-sensible amine oxydase). Par la suite, certains facteurs de transcription vont augmenter ce qui va favoriser l'inflammation, ainsi que l'augmentation des ROS induisant le remodelage de la matrice extracellulaire. Ces changements vont induire une diminution du collagène et une perte des CMVL (Fennell et al. 2016). La forme sacculaire de ces anévrismes proviendrait d'un déficit en collagène induit par l'association de ces facteurs, dans la limitante élastique interne associée à une diminution de la tunica média (Keedy 2006). La paroi vasculaire est donc affaiblie et a perdu progressivement son intégrité.

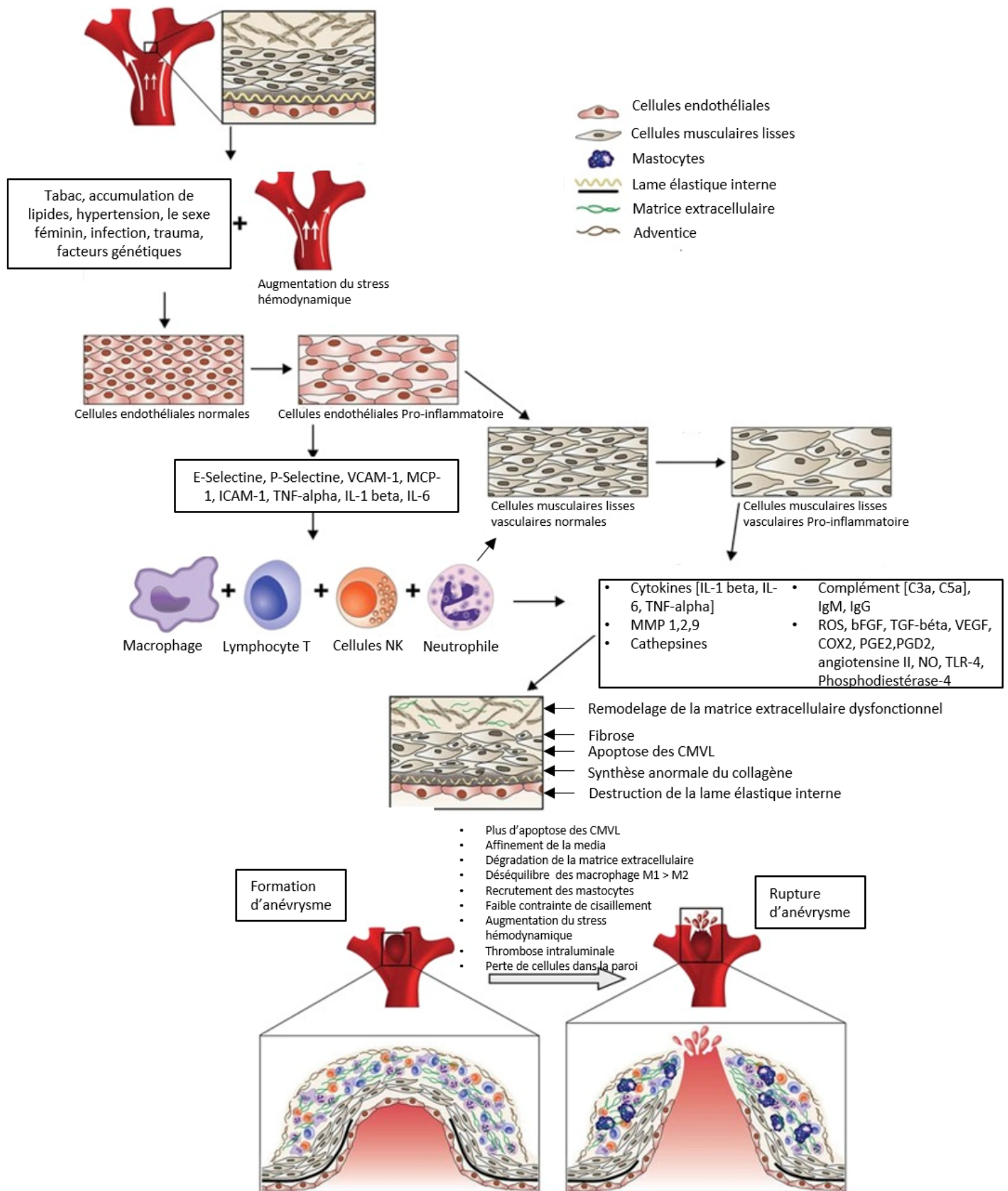


Figure 9: Schéma de la formation, de la croissance et de la rupture d'un anévrisme intracrânien.

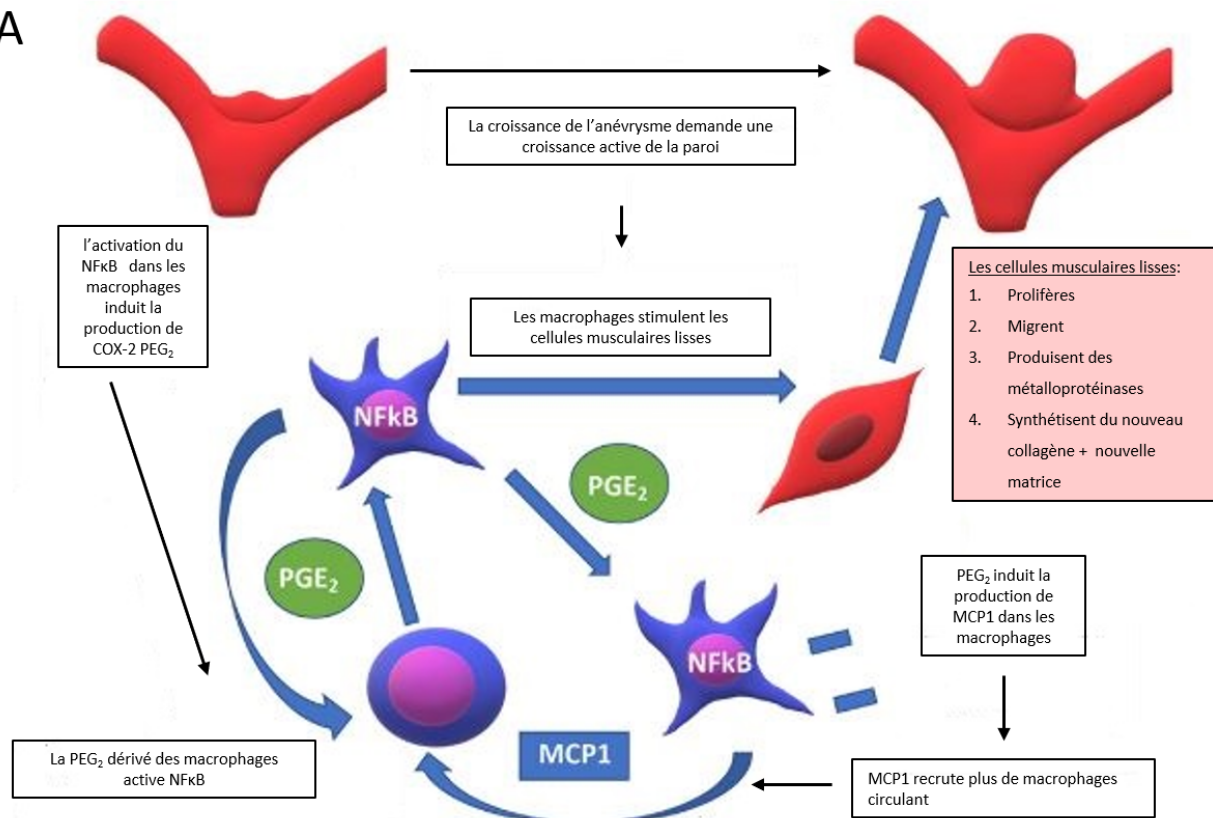
La formation d'un anévrisme est initiée par une dysfonction endothéliale stimulée hémodynamiquement. Une réponse inflammatoire impliquant plusieurs cytokines et médiateurs de l'inflammation. De manière parallèle, les cellules musculaires lisses (CMVL) subissent un changement de phénotype les rendant pro-inflammatoires. La réponse inflammatoire dans la paroi vasculaire engendre la dégradation de la lame élastique interne, la digestion de la matrice extracellulaire, et la formation d'anévrisme. La perte de cellules de la paroi, l'inflammation et la dégradation de la paroi vasculaire va possiblement entraîner la rupture de l'anévrisme. Image modifiée depuis Chalouhi et al. 2011.

8.3 La croissance des anévrismes intracrâniens

La croissance d'un anévrisme est relativement variable, certains vont montrer une expansion stable ou d'autres vont montrer une croissance rapide et désordonnée avant d'atteindre une zone de stagnation en termes de croissance. Lorsque les cellules immunitaires ont infiltré la paroi vasculaire, que la matrice extracellulaire est atteinte et qu'il y a une perte de la lame élastique interne, l'anévrisme va bourgeonner et croître. Cela nécessite le renouvellement de la paroi par la synthèse de matrice extracellulaire. Les CMVL sont indispensables à la croissance, car elles sont nécessaires pour la synthèse du collagène (Frösen et al. 2004). Elles vont également exprimer des récepteurs de facteurs de croissance qui ont été sécrétés notamment par les macrophages (Frösen et al. 2006). Par la suite, une boucle de rétroaction va se mettre en place, *via* l'activation des macrophages et de la prostaglandine E2 produite par la COX2. La E2 active le facteur de transcription nucléaire kappa b (NFkB) qui engendre l'expression de la protéine d'adhésion chimiotactique macrophage 1 (MCP-1) et de la COX 2 par d'autres macrophages ce qui continue la boucle de rétroaction en recrutant de nouveaux macrophages (Hasan et al. 2012). Un autre facteur impliqué dans la croissance des anévrismes semblerait être la présence de thrombose partielle se formant à l'intérieur de l'anévrisme. Ce phénomène se produirait suite à la stagnation des éléments du sang dans le flux intra-sacculaire et au changement structurel de la poche entraînant un changement au niveau des contraintes de cisaillement (Frösen et al. 2019). La présence d'un caillot pourrait conduire à la lésion de l'endothélium et de la lame élastique interne, au recrutement de cellules inflammatoires et induire la croissance de l'anévrisme (Frösen et al. 2012; Nagahiro et al. 1995). Dans une grande partie des AI, les cellules musculaires lisses deviennent des cellules

spumeuses dues à l'accumulation de lipides ce qui affecte leurs fonctions normales. La paroi ne peut plus s'adapter aux conditions hémodynamiques et s'affaiblit. La mauvaise fonction des cellules endothéliales est un facteur clé dans l'accumulation de lipides au sein de la paroi de l'anévrisme (Frösen et al. 2013).

A



B

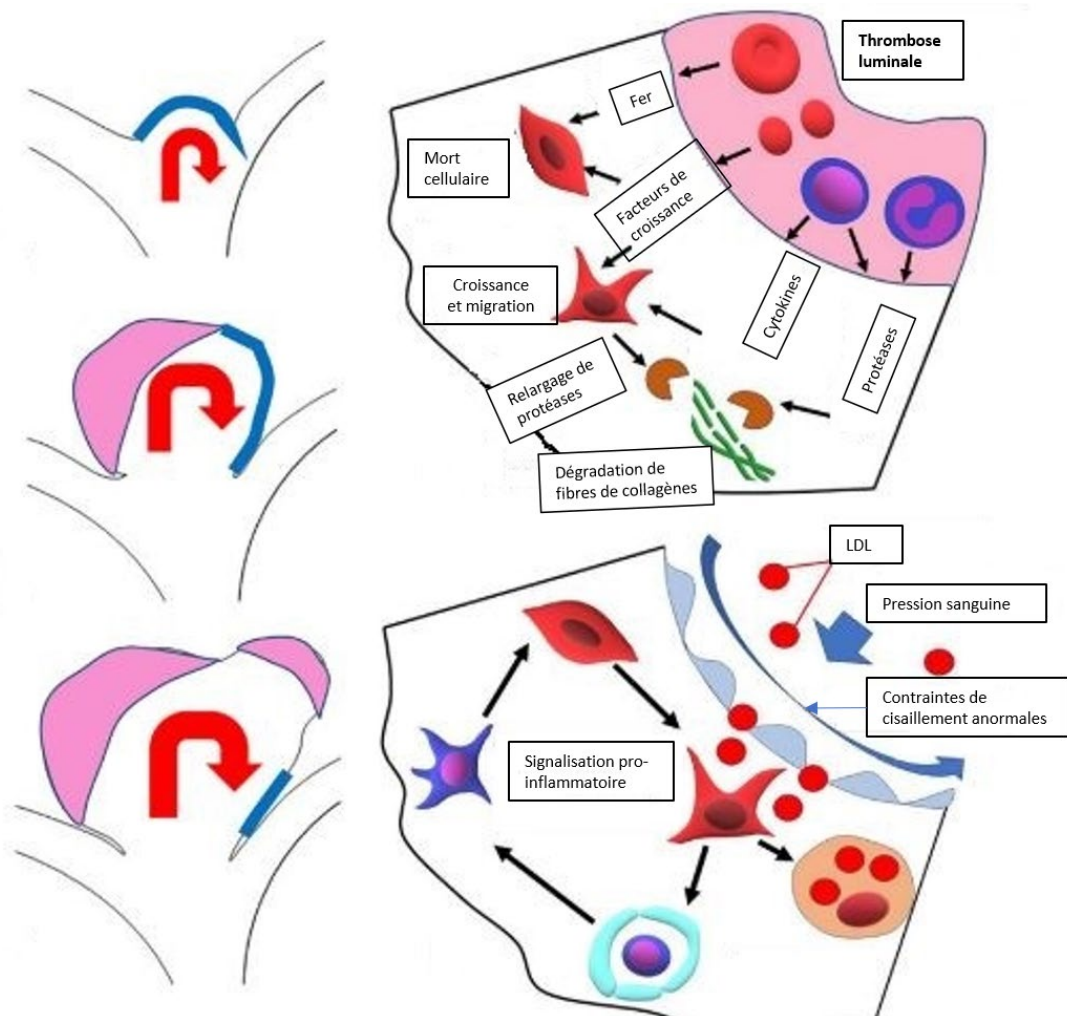


Figure 10: Représentation schématique de la croissance d'un anévrisme.

A, les cellules musculaires de la paroi des anévrismes synthétisent du nouveau collagène et expriment également des récepteurs pour des facteurs de croissance eux-mêmes sécrétés par les macrophages. Cela va stimuler la synthèse de la matrice et la croissance de l'anévrisme. La stimulation constante des cellules musculaires lisses par les macrophages et leur recrutement est lui-même amplifié par une boucle de rétroaction via la prostaglandine E_2 (PEG2) produite par les COX2 activés par NF κ B produit par d'autres macrophages. Cela augmente la régulation de MCP1 et de COX2 initiant cette boucle. Ce phénomène permet la croissance des anévrismes.

B, lorsque l'anévrisme grandit, les conditions hémodynamiques varient pour donner suite au changement de la géométrie de la lumière de l'anévrisme. Cela va modifier les contraintes de cisaillement, particulièrement sur les surfaces de la paroi exposée à de fortes contraintes (flèche bleue sur les figures B1, B2, B3). Ces régions sont plus susceptibles de subir un remodelage comme lors de l'initiation de la formation des anévrismes. Ce qui peut expliquer dans certains cas la croissance focale d'une seconde poche. Dans les anévrismes plus petits, une plus grande partie de la paroi est soumise à des contraintes de cisaillement plus fortes, lorsque la poche de ce dernier grandit la portion de la paroi soumise à ces contraintes de cisaillement élevées devient de plus en plus faible. Plus la poche est grande, plus la probabilité de formation de thrombus dans la lumière de l'anévrisme est grande (figure B4, B5). La présence d'un thrombus va stimuler le remodelage de la paroi via le relargage de cytokines et de facteurs de croissance stimulant le phénotype pro-inflammatoire des CMVL. Cela va engendrer la sécrétion de protéases et dégrader la matrice extracellulaire. Image adaptée de Frösen et al. 2019.

8.4 La rupture d'un anévrisme intracrânien

La rupture d'un anévrisme intracrânien est la cause principale d'hémorragies sous-arachnoïdiennes (Chemmanam and Davis 2009). Elle conduit à de grands taux de mortalité et d'invalidité avec une incidence entre 10 et 15 pour 100 000 en occident et jusqu'à 30 pour 100 000 dans certaines populations à risque, comme en Asie ou en Finlande (Fukuhara 2015; De Rooij et al. 2007; Roux, Winn, and Newell 2004). Des données épidémiologiques suggèrent que seulement une petite partie des AI progressent vers la rupture de manière chronique. Le taux de fatalité d'une hémorragie subarachnoïdienne due à un anévrisme reste entre 30 et 40. % (Nieuwkamp et al. 2009). Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes conduisant à une rupture d'anévrisme, pour améliorer l'issue des patients avec un AI.

La rupture d'un anévrisme surviendrait après l'affinement progressif de la paroi, due à la perte de cellules, à l'augmentation des processus inflammatoires et à la dégradation de la matrice extracellulaire. Lorsque l'anévrisme commence à croître, il va être sujet à une augmentation de la tension de la paroi. Pour éviter la rupture, la paroi doit s'adapter à cette augmentation de la charge mécanique, cette adaptation se fait normalement par la prolifération des CMVL et le dépôt de collagène. Lors de l'examen histologique d'anévrismes rompus et non rompus, les anévrismes rompus montraient une paroi vasculaire sans cellules musculaires lisses, sans fibres de collagène, mais elles montraient une infiltration de cellules inflammatoires (macrophages et leucocytes). La paroi des anévrismes était presque entièrement remplacée par une structure hyaline (Kataoka et al. 1999). Il y aurait donc un changement structurel fragilisant les anévrismes et les rendant plus susceptibles de rompre. De plus, les fibres de collagène dans les anévrismes non rompus semblent être orientées dans le même sens que le flux et les contraintes de cisaillement (Cebal et al. 2016).

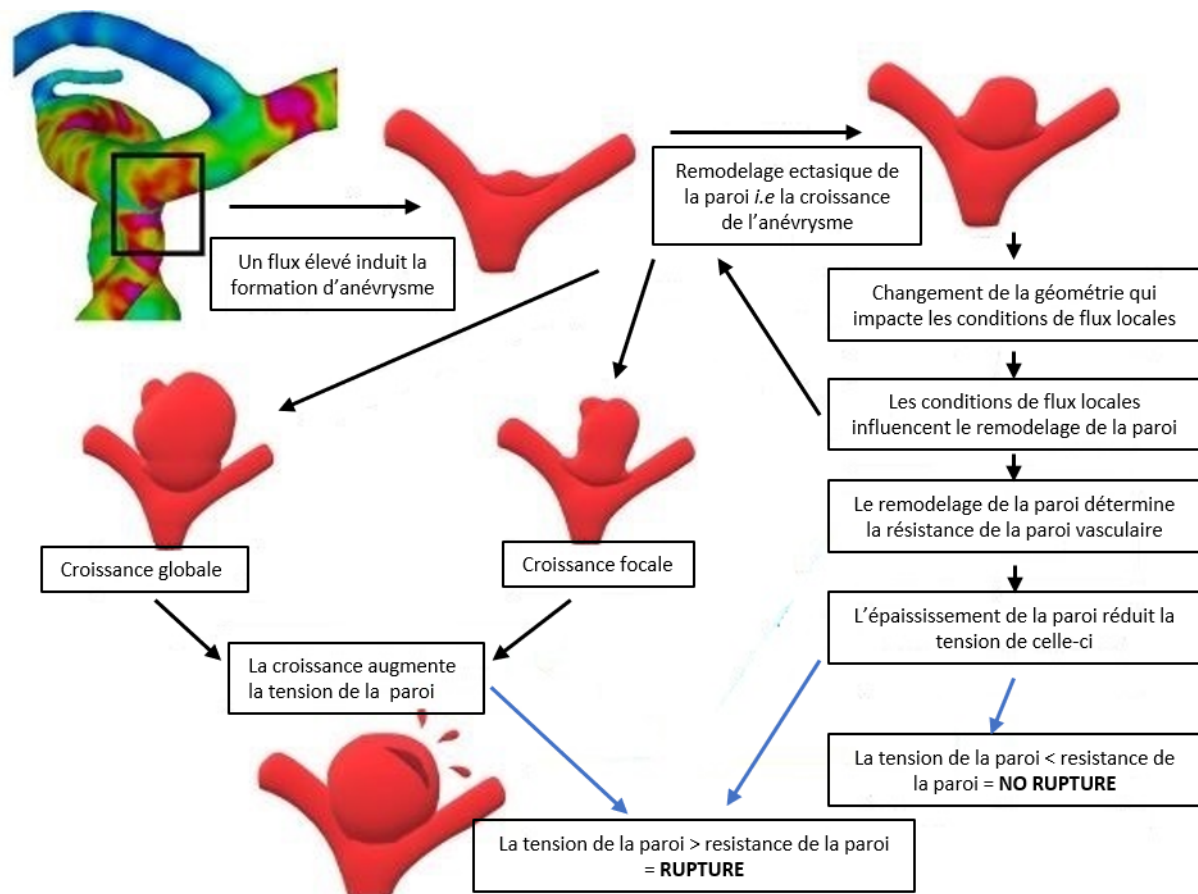


Figure 11 : Représentation schématique de l'initiation, la croissance et la rupture d'un anévrisme.

Le remodelage induit par les contraintes de cisaillement prédispose l'initiation d'anévrismes et leur croissance. La géométrie de ce dernier va également évoluer en fonction des modifications hémodynamiques soit par une croissance focale soit par une croissance généralisée. Cette croissance va impacter la pression de la paroi. Le remodelage de cette paroi va déterminer la résistance et la force de cette dernière. La force, la résistance et la pression de la paroi sont trois facteurs déterminants pour l'intégrité structurelle de cette paroi. Le flux sanguin à l'intérieur du sac anévrisimal va influencer ces facteurs, ce qui est un facteur déterminant dans la rupture des anévrismes. Image adaptée de Frösen et al. 2019

Plusieurs caractéristiques de la géométrie des anévrismes ont été étudiées pour mieux prédire leur rupture, comme notamment la taille maximale d'un anévrisme. Un seuil critique au-delà duquel le risque de rupture augmenterait, cette taille serait comprise entre 5mm et 10mm. Il existerait une corrélation entre la taille maximale et la rupture (Murayama et al. 2016; Williams and Brown 2013). Cependant, des données comparant la taille des anévrismes rompus et non rompus ne montrent pas de réelles différences (San Millán Ruíz et al. 2006). Le

taux de croissance des anévrismes est donc un point sensible nécessitant des recherches pluridisciplinaires (Lasheras 2007). D'autres études reposent sur l'examen de certains ratios notamment le ratio d'aspect (soit la hauteur de l'anévrisme divisé par son collet). Des études ont mis en évidence que ce rapport serait plus élevé chez les anévrismes rompus que chez les anévrismes non rompus (Kleinloog et al. 2018; Raghavan, Ma, and Harbaugh 2005; Sadasivan et al. 2013). Le ratio de taille (soit la taille de l'anévrisme sur la taille du vaisseau), il semblerait que ce ratio soit prédictif de la rupture d'un anévrisme. Un ratio plus grand est associé à des patterns de flux typique des anévrismes rompus, ce ratio sera particulièrement intéressant pour les anévrismes de petite taille (Kashiwazaki and Kuroda 2013; Tremmel et al. 2009).

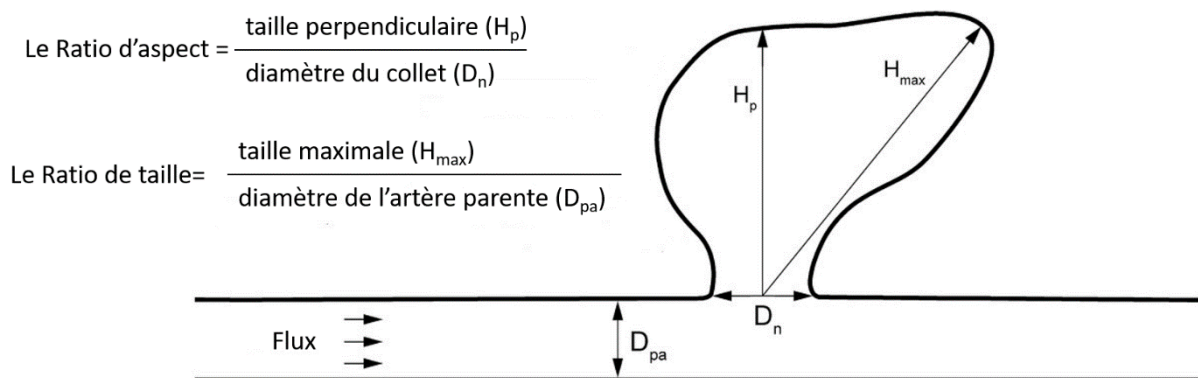


Figure 12: Équations utilisées pour le calcul du ratio d'aspect et du ratio de taille.

Le ratio d'aspect correspond à la taille perpendiculaire divisée par le diamètre du collet de l'anévrisme. Le ratio de taille est obtenu par la taille maximale de l'anévrisme divisé par le diamètre de l'artère parente de l'anévrisme. Image adaptée depuis Molenberg et al. 2019

8.5 Étiologie des anévrismes intracrâniens

L'étiologie des anévrismes intracrâniens n'est malheureusement pas claire. Cela est dû aux composants multifactoriels de cette pathologie.

Des études sur son caractère héréditaire ont montré que l'historique familial pouvait être un facteur de risque dans la formation des anévrismes et la transformation hémorragique (Frösen et al. 2012). Il a été montré que l'incidence de la pathologie doublerait chez les personnes ayant un ou plusieurs parents du premier degré touchés par cette pathologie en comparaison à la population générale (Bromberg et al. 1995; Chalouhi et al. 2011). Certains *loci* génétiques ont été identifiés comme ayant une forte corrélation avec les cas familiaux d'AI entre par exemple : 1p34.3-p36.13, 19q13.3, Xp22, and 7q11 (Lindgren, Kurtelius, and von und zu Fraunberg 2017). D'autres *loci* ont également été identifiées dans les cas AI sporadique et familial (Bilguvar et al. 2008). D'autres études faites sur des jumeaux homozygotes ont ainsi montré que le risque de transformation hémorragique dépend plus de facteurs de risques modifiables que des gènes (Frösen et al. 2012). De plus, il est possible que des variabilités anatomiques touchant les différents vaisseaux cérébraux soient également impliquées (Van Kammen et al. 2018). L'héritabilité de cette pathologie reste donc controversée.

Il existe cependant une pathologie d'origine génétique, la Polykystose rénale autosomique dominante (PKD). Elle est due à une mutation des gènes PKD1 et PKD2. La prévalence des AI dans cette pathologie est entre 10% et 13%, proche de 25% pour ceux ayant un historique familial AI (Perrone, Malek, and Watnick 2015). On peut également citer comme maladie héréditaire associée avec la formation AI la dysplasie fibromusculaire et le syndrome Ehlers-Danlos type IV (Chalouhi et al. 2011).

Dans l'étude des facteurs de risques de la pathologie, il est important de dissocier les risques de formation et les risques de rupture ou de transformation hémorragique.

Les facteurs de risques modifiables et non modifiables pouvant influencer la formation sont :

Les facteurs non modifiables :

- L'âge, probablement dû au développement chronique des anévrismes (Frösen et al. 2012; Inagawa and Hirano 1990; Stehbens 1989).
- Le sexe, des études de cohorte sur la formation *de novo* des anévrismes ont mis en évidence que cette pathologie était plus fréquente chez les femmes (M. H. Vlak et al. 2011).
- La présence de multiples anévrismes.
- L'historique familial, les personnes ayant des parents qui ont développé des anévrismes ont plus de risque d'en développer à leur tour (Chalouhi et al. 2011).

Les facteurs modifiables :

- La consommation de tabac.
- L'hypertension, lorsqu'ils sont combinés ces deux facteurs sont d'autant plus néfastes (Ferns et al. 2011; Frösen et al. 2012; M. H. M. Vlak et al. 2013).
- En outre, il semble que tous les facteurs influençant soit la résistance de la paroi vasculaire soit le stress hémodynamique peuvent être des potentiels facteurs de risque (Frösen et al. 2012).

Les facteurs de risques influençant la rupture sont encore difficiles à identifier, car les causes exactes de ces ruptures ne sont pas encore toutes connues. Cependant il est possible que la forme, la taille ainsi que la position anatomique de l'anévrisme influencent énormément le risque de rupture (Frösen et al. 2012). Certains autres facteurs impliqués dans la rupture des anévrismes et les hémorragies sous-arachnoïdiennes ont pu être identifiés :

- L'hypertension non traitée
 - Le sexe féminin.
- Ces deux facteurs semblent être impliqués dans le risque de transformation hémorragique (L. C. Brown and Powell 1999; Frösen et al. 2012).
- L'alcoolisme sévère augmenterait également le risque d'hémorragies sous-arachnoïdiennes (Qin and Crews 2012).
 - L'historique familial, le risque d'hémorragies sous-arachnoïdiennes serait plus grand chez les personnes ayant des parents qui ont déjà développé cette pathologie.

9 L'activateur tissulaire du plasminogène

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une glycoprotéine de la superfamille des sérines protéase. Premièrement identifié dans la circulation sanguine (Aasted 1980) comme étant exprimé et libéré par les cellules endothéliales des vaisseaux. Il va jouer un rôle fibrinolytique dans la lumière de ces derniers. Son activité fibrinolytique se fait *via* l'activation du plasminogène inactif en plasmine active (H. Roger Lijnen and Collen 1995) qui va par la suite dégrader la fibrine constitutive des caillots sanguins. Par la suite d'autres de ces fonctions ont été découvertes, comme son implication dans plusieurs fonctions de la fertilité et de reproduction (Carmeliet et al. 1994). Il est également exprimé dans plusieurs types cellulaires comme les neurones, les oligodendrocytes, la microglie et dans plusieurs structures cérébrales (Sappino et al. 1993; Soreq et al. 1983). Il a notamment été identifié dans l'hippocampe (Salle and Strickland 2002) où il est impliqué dans la plasticité synaptique (Frey 1996). De plus en plus d'études démontrent que le tPA peut interagir avec une grande variété de protéines et récepteurs grâce à ses différents domaines. Il est donc capable d'exercer plusieurs fonctions sans dépendre de son activité catalytique (Thiebaut et al. 2018).

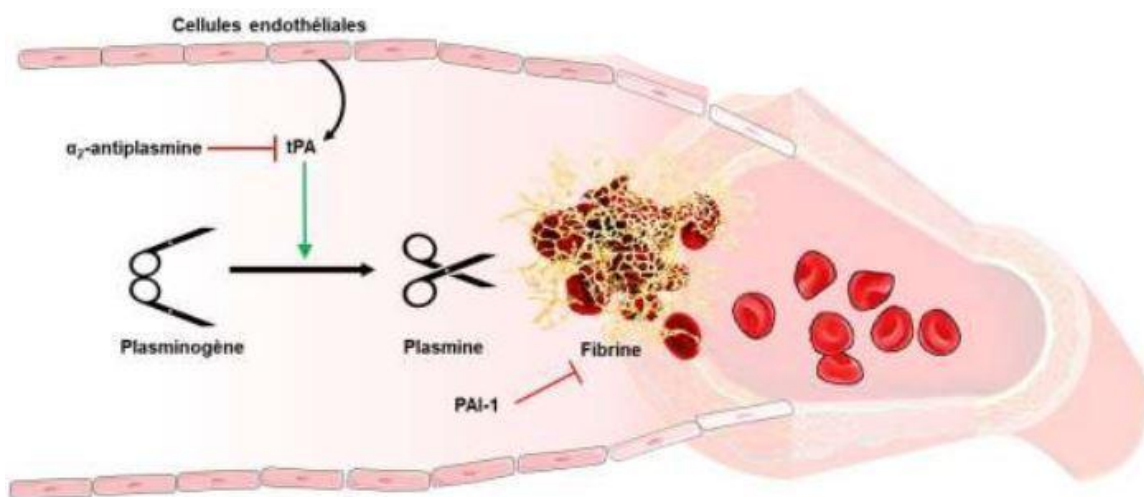


Figure 13: Fonction thrombolytique du tPA.

Le tPA est synthétisé et libéré par les cellules endothéliales dans la circulation où il est capable de cliver le plasminogène en plasmine au niveau des caillots de fibrine. La plasmine peut alors dégrader la fibrine et ainsi lyser les caillots sanguins. Figure depuis Collen and Lijnen 1991

Le tPA est codé par le gène PLAT (*plasminogen activator tissue type*) qui se trouve sur le chromosome 8 (Tripputi et al. 1986). Il est dans un premier temps synthétisé sous la forme d'un polypeptide de 527 acides aminés avec une masse moléculaire de 69kDa (Pennica et al. 1983).

Le tPA existe sous deux formes, une forme simple chaîne et une forme double chaîne. Il est synthétisé sous sa forme simple chaîne (sc-tPA, *Single chain*) zymogène et peut être clivé en forme double chaîne (tc-tPA, *two chain*) (Rijken and Collen 1981). Le clivage du tPA se fait avec l'hydrolyse de la liaison peptidique de l'arginine 275 et de l'isoleucine 276 par différentes protéases comme la plasmine ou la kallikréine. La chaîne lourde et la chaîne légère du tPA restent liées grâce à un pont disulfure entre la cystéine 299 et la cystéine 430. Dans le cas du tPA les deux formes possèdent la même activité en absence de régulateur allostérique (ex. : la fibrine). Cependant, on remarque une plus grande activité protéolytique de la forme double chaîne en leur absence, une activité jusqu'à 5 fois supérieures (Petersen 1988).

9.1 La structure du tPA

Le tPA est composé de 5 domaines. Sur la lourde chaîne du tPA, de l'extrémité N-terminal à l'extrémité C-terminal, on trouve le domaine fibronectin-type 1 (*finger*), situé entre les résidus 4 à 50. Il est impliqué dans la liaison du tPA à la fibrine formant un complexe tertiaire avec le plasminogène (Hébert et al. 2016; Kagitani et al. 1985). Ce domaine est également responsable des interactions du tPA avec des récepteurs membranaires comme le Low-Density-Lipoprotein-Receptor-related-Protein (LRP) et l'annexine II (Bu et al. 1992; Hajjar, Jacovina, and Chacko 1994; Hébert et al. 2016). Le domaine suivant est le domaine similaire au facteur de croissance épidermique (EGF-like). Situé entre les résidus 50 à 87, ce domaine permet l'activation du facteur de croissance épidermique (EGF). Ensuite il y a le domaine Kringle 1 et le domaine Kringle 2. Le domaine Kringle 1 est situé entre les résidus 87 à 176 et le domaine Kringle 2 est situé entre les résidus 176 à 256. Ces deux domaines sont composés d'un site actif ayant une forte affinité pour la lysine (Lysine binding site, LBS). Ce site est composé d'acides aminés hydrophobiques (tryptophane). Ces deux acides aminés vont former une poche dans la structure finale de la protéine. Les fonctions du domaine Kringle 1 ne sont à ce jour que peu connues et son site actif LBS n'est pas actif. Cependant, il semble être

impliqué dans la clearance du tPA dans le foie (Otter et al. 1992). Le domaine Kringle 2 possède un site le *lysine binding site* actif. Ce domaine est impliqué dans la liaison et l'activation de plusieurs substrats (le plasminogène, le PDGF-cc (platelet derived growth factor-cc)(Fredriksson et al. 2005) et le NMDAR (N-methyl-D-Aspartate Receptor) (Lopez-Atalaya et al. 2008; Nicole et al. 2001). Sur la chaîne légère du tPA, on trouve le seul domaine contenant l'activité catalytique de la protéine. Cette activité catalytique est possible grâce à une triade d'acides aminés, une histamine³²², un acide aspartique³⁷¹ et une serine⁴⁷⁸. Cela permet l'activation du plasminogène en plasmine.

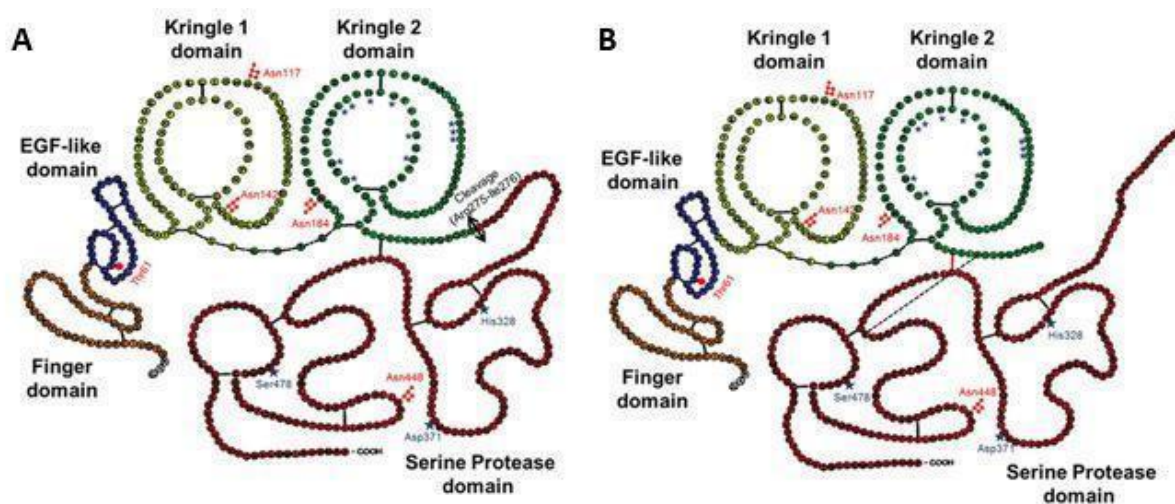


Figure 14 : Représentation schématique du tPA simple chaîne A et double chaîne B après clivage.

Les sites de glycosylation sont indiqués en rouge. Les acides aminés du tPA composant la triade catalytique sont indiqués par une étoile. Les acides aminés du site actif LBS dans le domaine Kringle 2 sont indiqués par un astérisque. Le tPA est synthétisé sous forme simple chaîne (sc-tPA) et peut être clivé en forme double chaîne (tc-tPA). Le tPA comporte 5 domaines (Finger, EGF-like, Kringle 2 et sérine protéase), 17 ponts disulfures, 3 sites N-glycosylation et 1 site d'O-glycosylation. Le graphique est adapté de Chevilly et al. 2015 et Lesept et al. 2016.

9.2 Expression et sécrétion du tPA

Le tPA est synthétisé dans les cellules endothéliales et excrété dans le compartiment vasculaire. En particulier dans les microvaisseaux (Levin and del Zoppo 1994) la sécrétion du

tPA se fait de deux manières ; soit de manière continue (Angles-Cano et al. 1985), soit en réponse à un stimulus, par exemple : la présence de facteurs de la coagulation, l'hypoxie ou une augmentation de la pression sur la paroi vasculaire (Diamond, Eskin, and McIntire 1989). La demi-vie dans la circulation du tPA, chez l'homme, est d'environ 6 minutes (Verstraete et al. 1985) . Cette faible demi-vie peut être expliquée principalement par deux facteurs, son inhibition *via* PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor*, voir plus bas) et sa clearance hépatique. La clearance du tPA se fait par endocytose dans le foie. Les hépatocytes et les cellules endothéliales hépatiques expriment plusieurs récepteurs membranaires permettant cette recapture. Les récepteurs au mannose et les récepteurs LRP (Yepes et al. 2003). La clearance du tPA dans le foie est possible pour le tPA libre et le tPA lié à ses inhibiteurs (Chandler et al. 1997).

Comme abordé plus haut, le tPA a d'abord été identifié dans la circulation puis il a été mis en évidence dans d'autres organes comme : l'utérus, les poumons, les muscles, le cœur, les reins, puis le système nerveux central (SNC) (Albrechtsen 1957). Son expression est le plus souvent due à un remodelage tissulaire et/ou à une vascularisation.

9.3 Les inhibiteurs du tPA

Les inhibiteurs du tPA font partie de la famille des serpins. Il existe 4 serpins connues comme inhibiteur du tPA :

- PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor 1* ou serpine 1 c'est le principal inhibiteur du tPA. Elle est présente en grande quantité dans le plasma ou elle est exprimée par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses des vaisseaux et les plaquettes. Elle va inhiber l'activité protéolytique du tPA dans la circulation générale et participe également à sa clearance (Nagaoka et al. 2002), elle va inhiber les deux formes du tPA, le sc-tPA et le tc-tPA (Rijken and Collen 1981). Les complexes formés entre le tPA et PAI-1 sont irréversibles, l'inhibition du tPA est donc quasiment définitive (Zhou, Carrell, and Huntington 2001).

- PAI-2 : *plasminogen activator inhibitor 2*. En condition physiologique cette protéine est quasiment indétectable dans le plasma. Cependant, lors de la grossesse elle va être exprimée par les trophoblastes et libérée dans la circulation en plus grande quantité (Åstedt, Lecander, and Ny 1987).
- La neuroserpine : exprimée quasiment exclusivement dans le parenchyme cérébral, cette dernière n'étant pas présente dans la circulation, elle n'a aucun rôle sur le tPA circulant. Elle est synthétisée quasiment exclusivement par les neurones (Docagne et al. 1999; Osterwalder et al. 1996). La neuroserpine peut inhiber les deux formes de tPA bien qu'elle inhibe le tc-tPA plus efficacement (Osterwalder et al. 1996). L'inhibition du tPA par la neuroserpine ne semble pas être totale, car une activité fibrinolytique de ce dernier a été observée dans plusieurs structures cérébrales (Teesalu et al. 2004). Il est possible que les complexes formés entre le tPA et cet inhibiteur soient instables, ils ont également une demi-vie beaucoup plus courte que les autres complexes serpine-tPA (Carlson et al. 2016; Ricagno et al. 2009).
- La nexine-1 ou serpine 2 : elle lie préférentiellement la thrombine, mais également la trypsine, les activateurs du plasminogène, la plasmine et certains facteurs de coagulation (Evans LI. et al. 1991; Scott et al. 1985). Bien que sa concentration plasmatique soit relativement faible, elle est cependant retrouvée dans plusieurs organes et notamment dans les vaisseaux sanguins où elle est sécrétée par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les plaquettes (Baker and Gronke 1986). Dans le système nerveux central, elle est exprimée par les cellules gliales et les neurones (Gioor et al. 1986; Simpson, Johnston, and Morris 1994) . Elle est également retrouvée en abondance autour des cellules musculaires lisses et des pieds astrocytaires dans les vaisseaux cérébraux. Elle y jouerait un rôle protecteur en cas d'extravasation de la thrombine et des sérines dans le parenchyme cérébral (Choi et al. 1990).

9.4 Le rôle du tPA dans le système nerveux central

Le tPA est présent dans diverses régions cérébrales et peut être exprimé par différents types de cellules du système nerveux central. Il est capable d'interagir avec un grand nombre de protéines à travers les différentes fonctions de ses 5 domaines.

Le tPA serait capable d'activer le récepteur NMDA (récepteurs ionotropiques activés par le glutamate et la glycine (Lehmann, Colpaert, and Canton 1991)). Cela conduit à des processus physiologiques comme les processus d'apprentissage et de mémorisation (Benchenane et al. 2007; Obiang et al. 2012), mais aussi à des processus pathologiques comme l'excitotoxicité, la mort neuronale ou encore l'épilepsie (Bertrand et al. 2015; Nicole et al. 2001; Parcq et al. 2013; Qian et al. 1993).

Le tPA est capable de cliver la partie N-terminal de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA (NMDAR). Ce clivage se fait grâce au domaine Kringle 2 et à l'activité protéolytique du sc-tPA (Lopez-Atalaya et al. 2008; Parcq et al. 2013). Dans les neurones, il augmenterait l'influx calcique par le NMDAR (Nicole et al. 2001). Ce clivage se ferait sur l'arginine²⁶⁰ (Fernández-Monreal et al. 2004). D'autres études ont par la suite montré que la liaison de la partie N-terminal du tPA à la lysine¹⁷⁸ de la sous-unité GluN1 serait responsable d'une augmentation de la dynamique des récepteurs NMDA extrasynaptiques dans un premier temps et de l'influx calcique, dans un second temps (Lesept et al. 2016). Il est également possible que l'activation du NMDAR par le tPA se fasse de manière indirecte par le récepteur LRP présents sur les neurones (Samson et al. 2008). L'activation du NMDAR par le tPA peut conduire à des processus pathologiques comme l'excitotoxicité et la mort cellulaire (Bertrand et al. 2015).

Cependant son effet pro-excitotoxique est controversé. Une étude réalisée en 2013 a montré que le tPA peut diminuer la mort cellulaire de type excitotoxique. Et cela par un mécanisme indépendant de l'activité enzymatique du tPA, faisant intervenir les récepteurs extrasynaptiques contenant la sous-unité GluN2A. Ils sont responsables de l'activation de la voie Erk1/2-CREB-ATF3 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2 - cAMP response element binding protein - activating transcription factor 3*) (F. Wu et al. 2012). Il semblerait également que les effets du sc-tPA et du tc-tPA soient opposés. Le sc-tPA serait pro-excitotoxique alors que le tc-tPA serait plutôt neuroprotecteur. Cet effet neuroprotecteur se ferait *via*

l'interaction du tPA avec le récepteur à l'EGF en diminuant l'influx calcique dans les neurones (Bertrand et al. 2015; Parcq et al. 2013).

En plus de son action sur les NMDAR dans les neurones, le tPA a été montré comme pouvant interagir avec le récepteur NMDA sur les cellules endothéliales (Mehra et al. 2020; Reijerkerk et al. 2010). La présence de glutamate (agoniste du NMDAR) et du tPA sur les NMDAR endothéliaux dans le SNC déclencherait un mécanisme de signalisation impliquant Rho GTPase ce qui part une voie dépendante des ROCK (*Rho-associated protein kinase*) va entraîner la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et augmenterait la perméabilité de la paroi vasculaire (Mehra et al. 2020). Ce qui favoriserait le passage de cellules inflammatoires à travers la barrière hématoencéphalique (Mehra et al. 2016; Reijerkerk et al. 2008, 2010).

En effet le tPA peut participer à l'ouverture de la barrière hématoencéphalique de plusieurs manières, d'une part *via* son interaction avec le récepteur LRP qui se fait par le domaine finger. Le LRP est situé sur les pieds astrocytaires périvasculaires. Cette interaction permettrait le passage du tPA vasculaire vers le parenchyme cérébral ainsi que le décrochage des pieds astrocytaires de la lame basale et l'ouverture de la barrière hématoencéphalique. Une autre manière par laquelle le tPA participe également à l'altération de la BHE, est par son interaction avec le PDGF-CC (*Platelet-derived growth factor receptor cc*) *via* le domaine Kringle 2 et le domaine catalytique (Fredriksson et al. 2004; Su et al. 2008). L'activation des MMP par le tPA peut également altérer la BHE. Il est capable d'activer les MMP-9, 2 et 3. Cela va fragiliser les jonctions serrées de la lame basale dans les vaisseaux cérébraux (Eeckhout and Vaes 1977; He et al. 1989; Suzuki et al. 1990).

10 L'activateur tissulaire du plasminogène : outil thérapeutique dans les AVC

10.1 Le tPA : outil thérapeutique dans les AVC ischémiques

Le tPA est aujourd'hui utilisé comme traitement thrombolytique dans plusieurs indications. Il est utilisé comme thrombolytique dans les embolies pulmonaires, les infarctus du myocarde et les accidents vasculaires ischémiques aigus.

Dans le cas des AVC ischémiques aigus, l'injection intraveineuse de tPA doit se faire dans les 4,5h après le début des symptômes (Hacke et al. 2008). L'altéplase® est à l'heure actuelle le *gold standard* pour ces interventions (Furie et al. 2011). Cependant, il existe certaines limites à son utilisation, par exemple la fenêtre de traitement limitée à 4,5h (Hacke et al. 2008), le faible taux de recanalisation avec l'utilisation du tPA (Bhatia et al. 2010) ainsi que le risque d'hémorragies parenchymateuses symptomatiques après traitement (The National Institute of Neurological Disorder and Stroke rt-PA Stroke Study Groupe 1995) .

10.2 Le tPA : outil thérapeutique dans les AVC hémorragiques

Comme expliqué plus haut dans le [chapitre 6, Essais cliniques et perspectives de traitements](#), le rtPA est utilisé comme thrombolytique conjointement à une chirurgie *minimally invasive*.

Les chirurgies *minimally invasive* couplées à l'utilisation du rtPA ont montré des résultats prometteurs pour l'amélioration clinique du patient dans les hémorragies intracérébrales et intraventriculaires. Cependant, elles n'ont pas montré de supériorité thérapeutique de ces techniques dans les ICH. Malgré que les études CLEAR et MISTIE (Hanley et al. 2016, 2017, 2019; Naff et al. 2011) ont permis de démontrer la sécurité de l'injection de rtPA, certains doutes persistent. En effet, d'autres études ont montré que l'exposition du tissu neuronal au tPA pouvait être nocif pour le parenchyme cérébral (Chen et al. 2003; Mali, Cheng, and Chintala 2005; Tsirka, Rogove, and Strickland 1996). Il a également été démontré que

l'injection de rtPA pouvait aggraver l'œdème dans des modèles *in vivo* d'ICH et IVH chez le cochon (Ducruet et al. 2010; Thiex et al. 2003).

Une augmentation des saignements a également été observée à 72h après l'injection de rtPA dans l'étude MISTIE II (Hanley et al. 2016). De plus, un troisième groupe avec une dose plus élevée de rtPA était initialement prévu dans l'étude MISTIE de phase II, mais n'a pas été conduit après examen du conseil de surveillance et de sécurité (Hanley et al. 2016). Il est possible que l'augmentation de la concentration de rtPA ait un impact négatif sur la balance bénéfice-risque de ce type d'intervention. Même si la corrélation entre les hémorragies asymptomatiques et l'injection de rtPA n'as pas été étudiée. Et aucun lien entre l'œdème et l'injection de rtPA n'a été retrouvé chez l'Homme. Il serait intéressant d'améliorer la balance bénéfice-risque de cette stratégie et cela en utilisant un thrombolytique potentiellement plus sûr.

Une autre préoccupation quant à l'utilisation du rtPA est sa courte demi-vie dans la circulation sanguine (Fuchs, Berger, and Pizzo 1985; Verstraete et al. 1985), cela influence le résultat de la thrombolyse et également son utilisation. En effet, son utilisation nécessite des protocoles d'injections répétées (1 injection toutes les 8h, jusqu'à 9 injections si nécessaire) (Hanley et al. 2016) pour maximiser sa concentration au cours du temps afin d'obtenir l'effet thrombolytique voulu. Cependant, cela augmente le risque d'effets secondaires négatifs, tel que le risque de resaignement.

11 L'activateur tissulaire du plasminogène dans la physiopathologie des anévrismes

L'Étude de l'impact du tPA dans l'anévrisme a d'abord débuté dans les anévrismes aortiques abdominaux (AAA). En effet, la pathogenèse de l'anévrisme aortique est marquée par la dégradation enzymatique de la lame élastique interne et des protéines de la matrice extracellulaire (collagène, élastine ...). La plasmine a été pensée comme étant un acteur de physiopathologie de cette maladie (Jean-Claude et al. 1994), car outre ses fonctions fibrinolytiques dans le plasma, elle joue également un rôle dans la dégradation tissulaire (Eeckhout and Vaes 1977; He et al. 1989; H.R. Lijnen et al. 1998). C'est pour cela que les activateurs tissulaires du plasminogène ont été étudiés dans cette pathologie, afin de mieux comprendre les mécanismes menant à l'activation de la plasmine (Lindholt 2006). Tout d'abord, une augmentation de l'expression du tPA dans la paroi des AAA a été identifiée (Reilly, Sicard, and Lucore 1994). Puis, une étude s'est intéressée aux activateurs de la plasmine comme potentiels marqueurs de la pathologie (Lindholt et al. 2003). Cette étude a montré une corrélation positive entre la concentration plasmatique de tPA et la croissance des AAA. D'autres études ont montré qu'une augmentation de l'expression de PAI-1 pourrait être protectrice dans cette pathologie (Oszajca et al. 2014).

Par la suite l'impact du tPA a donc été étudié dans les anévrismes intracrâniens. Notamment dans un modèle murin de cette pathologie. Une étude conduite dans la même unité où ce travail a pris place a mis en évidence l'impact du tPA dans la formation et la rupture des anévrismes intracrâniens dans un modèle murin (Labeyrie et al. 2017).

Dans cette étude, l'influence du tPA endogène a été étudiée en comparant des souris tPA knock-out (KO) (tPA — / —), PAI-1 KO (PAI 1 — / —) ainsi que dans leurs Wild type. Les animaux tPA KO étaient résistants à la formation des anévrismes et à leur rupture en comparaison aux animaux Wild type. Les animaux PAI-1 KO ont montré une plus grande propension à développer des anévrismes avec une rupture plus précoce ainsi qu'un plus grand taux de rupture que les animaux Wild type. Cela a démontré que le tPA endogène est impliqué à la formation et à la rupture des anévrismes.

Pour mieux comprendre si ce tPA était d'origine vasculaire ou parenchymateuse, des animaux tPA KO (tPA - / -) ont été transfectés avec un plasmide P-LIVE codant pour le tPA. Ce plasmide

possède un promoteur hépatocytaire induisant l'expression du tPA dans les hépatocytes permettant un relargage vasculaire d'un tPA actif 24h après la transfection. Ces animaux montraient un profil similaire aux animaux Wild type en termes de formation et de rupture des anévrismes. De plus, des coupes histologiques avec immunomarquage des anévrismes chez ces animaux ont bien montré la présence de ce tPA dans les parois de ces anévrismes. Le tPA impliqué dans cette pathologie serait donc vasculaire.

12 Projet de thèse

12.1 Développement d'un nouveau produit pour le traitement des accidents vasculaires hémorragiques

Comme expliqué plus haut, les hémorragies intracérébrales et intraventriculaires sont une urgence médicale avec un fort taux de mortalité et de morbidité. Malgré les résultats prometteurs des études cliniques sur l'utilisation du rtPA dans ces pathologies, il reste certains doutes quant à sa sécurité. Un thrombolytique plus sûr et avec une formulation à libération prolongée permettrait de pallier aux limitations et risques existants actuellement avec l'altéplase® pour l'amélioration du traitement des patients souffrant ICH ou IVH.

Op2Lysis développe un agent thrombolytique pour répondre aux besoins médicaux non satisfaits pour le traitement des AVC hémorragiques. L'O2L-001, il s'agit d'un thrombolytique de nouvelle génération l'OptPA (Goulay et al. 2018) formulé pour un relargage progressif. L'OptPA (W253R/R275S rtPA), est un variant de l'activateur tissulaire du plasminogène. Il possède deux mutations le rendant très intéressant pour son utilisation thérapeutique. La première, W253R, est la substitution d'un tryptophane par une arginine. Cette dernière est connue pour impacter la capacité du rtPA à interagir avec le NMDAR et supprimer les effets pro-excitotoxiques qui en découlent (Parcq et al. 2013). La seconde, R275S, soit la substitution d'une arginine en une serine, ce qui permet de réduire la sensibilité du rtPA à la plasmine sans affecter son activité fibrinolytique en présence de fibrine (Boose et al. 1989). Cette dernière mutation va donc permettre de diminuer le risque de saignement après traitement. L'OptPA est ensuite formulé pour un relargage progressif. En effet, dans les études cliniques utilisant le rtPA pour liquéfier et évacuer un hématome intracérébral, la courte demi-vie du rtPA a nécessité l'utilisation d'injections répétées de grande concentration. Ce qui peut augmenter le risque d'effets négatifs dû à l'exposition du tissu cérébral au tPA. Une formulation à relargage progressif permettrait donc de ne faire qu'une seule injection et de limiter le risque dû à l'exposition du tissu cérébral au rtPA. La formulation de l'O2L-001 repose sur la nanopréciptation de l'OptPA et la resuspension de ces nanoparticules dans un gel thermosensible, le Poloxamer 407. Une solution d'OptPA est précipitée par l'addition de

tetraglycol et doucement mélangée à 4°C. après centrifugation, seuls les précipités sont inclus dans une solution à 17% de Poloxamer 407.

Mon projet de thèse au sein d'Op2Lysis est de mettre en place des modèles *in vitro* pour le développement de l'O2L-001. Ces modèles doivent nous permettre d'identifier les paramètres influençant la thrombolyse, d'apporter les preuves de concept à l'utilisation de l'O2L-001, de caractériser le produit et sa formulation. Tout en prenant en compte les contraintes de la pathologie et en se rapprochant le plus possible de la situation clinique testée lors des études cliniques MISTIE. Pour cela, les modèles *in vitro* de thrombolyse sont faits sur des caillots de sang complet. Le sang étant le substrat final d'O2L-001, il est donc plus pertinent comme prédicteur des effets pharmacologiques de notre produit chez les patients.

Mon premier objectif est de mettre en place un modèle de thrombolyse sur sang humain permettant de déterminer les paramètres influençant la lyse ainsi que conditions optimales de dosage de rtPA en termes de concentration minimale et de temps d'exposition.

Mon deuxième objectif est de développer un second modèle plus complexe permettant de tester et valider l'efficacité de la formulation retard d'un thrombolytique et celle de notre produit formulé dans les conditions optimales précédemment définies.

Au sein d'Op2Lysis, mon travail de thèse repose essentiellement sur le développement de modèles permettant de tester, décrire et caractériser un produit pharmaceutique. Une partie de ces travaux ont permis la rédaction d'une famille brevet et d'une publication scientifique en cours de préparation.

12.2 L'impact du tPA dans l'anévrisme intracrânien

Aujourd'hui, il n'existe pas de traitement non invasif de l'anévrisme, et encore moins de traitement permettant de stabiliser le développement de celui-ci ou de prévenir sa rupture. De meilleures connaissances du développement des anévrismes et de leur physiopathologie permettraient de proposer des solutions de traitements ciblant ces mécanismes. Comme expliqué plus haut (dans le [chapitre 11, L'activateur tissulaire du plasminogène dans la physiopathologie des anévrismes](#)), il a été précédemment établi que le tPA vasculaire était impliqué dans la formation et possiblement la rupture des anévrismes intracérébraux.

Mon projet de thèse, au sein de l'équipe PhIND, est de valider les résultats précédemment établis dans le laboratoire en utilisant le même modèle d'anévrisme intracérébral chez le rongeur et cela avec une autre souche de souris, les tPA null et leur Wild type. En effet, contrairement aux souris tPA KO, chez lesquels le locus complet contenant le gène PLAT a été délété (Carmeliet et al. 1994), supprimant également d'autres gènes que celui du tPA (Carmeliet 1995) utilisé par Labeyrie en 2017 pour mettre en évidence l'influence du tPA endogène dans les anévrismes intracérébraux (Labeyrie et al. 2017). Les souris tPA null sont générées par la délétion d'un seul exon, l'exon 3, du gène PLAT (Pasquet et al. 2019). Seul le gène du tPA est impacté dans cette souche de souris. Reproduire ces expériences sur cette souche de souris permet donc de s'assurer que seul l'impact de l'absence du tPA est observé.

Pour confirmer que l'origine du tPA impliqué dans cette pathologie était bien vasculaire, nous utilisons, comme fait précédemment par Labeyrie en 2017, la transfection hydrodynamique d'un plasmide contenant un promoteur pour les hépatocytes et le gène du tPA chez des souris tPA null. Les souris transfectées vont donc exprimer par les hépatocytes un tPA strictement vasculaire. Cela nous permet de tester s'il est possible de retrouver le phénotype des souris Wild type avec une expression tPA strictement dans la circulation.

Dans un deuxième temps, pour mieux comprendre par quels mécanismes le tPA peut être impliqué dans cette pathologie, je vais étudier grâce à la transfection hydrodynamique l'impact de différents mutants du tPA dans la formation et la rupture des anévrismes. Les mutants du tPA choisis sont des tPA ayant été délétés d'un domaine ou d'une fonction connue pour ses effets dans le système nerveux central et pouvant être impliqués dans des voies de signalisation relative à cette pathologie.

Résultats

13 Article 1: "O2L-001, a sustain release formulation of an optimized tPA for an efficient and safe thrombolysis "

Les hémorragies intracérébrales sont actuellement un besoin médical non satisfait touchant près de 3 millions de personnes dans le monde chaque année. Les hémorragies cérébrales non traumatiques résultent de la rupture de vaisseaux sanguins fragilisés, formant un hématome dans le parenchyme cérébral. Ce qui engendre des lésions dues à l'effet de masse de l'hémorragie et de la toxicité du sang dans le parenchyme. Dans ce papier, nous évaluons l'efficacité de l'O2L-001, un nouvel agent thrombolytique l'OptPA encapsulé dans un gel permettant son relargage progressif et ainsi favoriser la liquéfaction d'un hématome avant son drainage. Pour cela, nous avons utilisé des modèles de thromolyse sur sang humain complet. Les résultats dans cet article montrent que l'augmentation du temps d'exposition du caillot à un thrombolytique permet d'obtenir une lyse plus efficace avec une concentration de thrombolytique plus faible et de ce fait, démontre l'importance d'une formulation à relargage progressif. De plus, nos résultats montrent que l'O2L-001 favorise une thromolyse efficace, grâce au relargage progressif de l'OptPA. Un variant du tPA moins sensible au plasminogène présentant donc un profil plus sûr. De ce fait, l'O2L-001 apparaît comme un nouvel espoir pour le traitement des hémorragies intracérébrales avec une thromolyse plus sûre et plus efficace.

Cet article est en cours de rédaction la version présentée ici est une version provisoire et risque d'être modifiée avant sa soumission.

O2L-001, a sustain release formulation of an optimized tPA for an efficient and safe thrombolysis

Estelle R Louet^{1,2}, Mélina Ianszen², Marie-Julie Guichard², Christophe Gaudin²,
Jerome Parcq^{2*}

¹ Normandie Univ, UNICAEN, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), 14000 Caen, France.

² Op2Lysis SAS, GIP Cyceron, Boulevard H Becquerel, 14000 Caen, France

Corresponding author (*): Jerome Parcq, PhD, Op2Lysis SAS GIP CYCERON, Bvd Becquerel, 14074 Caen Cedex, France; Tel: + 33 2 31470166; E-mail: jerome.parcq@op2lysis.com

Abstract

Intracerebral haemorrhage (ICH) is an unmet medical need affecting more than 3 million people every year. Non-traumatic ICH results from the rupture of a weakened blood vessel leading to the formation of an intracerebral hematoma and subsequent deleterious lesions. Here we evaluate the efficacy of O2L-001, a new thrombolytic agent, OptPA, entrapped in a slow-release polymer to favour thrombolysis of the hematoma before its drainage out of the brain. Using several clot models produced from human blood, we showed that O2L-001 favours higher thrombolytic efficacy by allowing an increased exposure to OptPA, a safer variant of tissue plasminogen activator, over a few hours. Therefore, O2L-001 appears as a new hope for ICH patients, with a safer and better thrombolytic capacity to reduce deleterious mass-effect.

Introduction

Intracerebral haemorrhage (ICH) is a life-threatening disease affecting more than 3 million people worldwide in 2013 and accounting for 40% of stroke's DALYs according to the Global Burden of Disease Study 2013 ¹. ICH may represent a 27€ billion cost across Europe in 2017, according to the study of healthcare economic burden of stroke, ischemic and hemorrhagic ². Nevertheless, there is still no therapeutic solution approved for ICH ^{3,4}. Non-traumatic ICH results from the rupture of a weakened blood vessel leading to the formation of an intracerebral hematoma and the subsequent deleterious lesions. While ICH is still an unmet medical need, several clinical trials of interest were conducted in the last decade. Minimally invasive surgery combined with a thrombolytic agent injection to liquefy the hematoma and favour its drainage, the MisTIE trial phase III failed to improve the proportion of patients treated with tissue plasminogen activator (rtPA) who achieved a good response 365 days after ICH (vs standard medical care). Nevertheless, this clinical trial highlighted a robust correlation between the volume of blood remaining at the end of the procedure and the clinical benefit ^{5,6}. The therapeutic strategy seemed effective, but the thrombolytic agent used in this trial may not be the most suitable. Indeed, beyond the potential side effects of rtPA in the brain, which are bleeding risks and pro-neurotoxicity mediated by the NMDA receptor ^{7,8}, the insufficient thrombolytic efficacy, may have played an essential role in the negative result of the MisTIE 3 trial.

Moreover, rtPA is known to have a short half-life in circulation and a short-acting effect in hematomas ⁹⁻¹¹ that may have jeopardized its therapeutic efficacy in the MisTIE trials. In the present publication, we hypothesized that O2L-001, a new generation of thrombolytic, may offer an increased thrombolytic activity and thus higher hematoma evacuation, with a better safety profile as a tailored treatment for hemorrhagic stroke. O2L-001 active compound is Optimized rtPA (W253R/R275S rtPA, OptPA), an engineered rtPA variant with two point-mutations to reduce neurotoxic properties and sensitivity plasmin ¹². O2L-001 excipient is a thermo-reversible gel of poloxamer 407, allowing the sustained-release property of the product over a few hours ¹³. We demonstrated here that the slow release of our innovative thrombolytic agent increased the thrombolysis on human hematoma versus the gold-standard thrombolytic agent. The higher efficacy observed with O2L-001 was explained by increased exposure of the hematoma to our thrombolytic agent at a concentration sufficient to achieve

blood clot lysis. Finally, we also emphasize the importance of using OptPA as the thrombolytic agent in O2L-001 instead of rtPA. This report confirms the lower amidolytic activity of OptPA and his lower potency to activate plasminogen in plasmin in the absence of fibrin compared to rtPA. OptPA has then a lower potential to trigger pro-bleeding factors such as plasmin or MMP.

Material & Methods

Materials

Human blood samples and derivatives (plasma) were obtained from the French Establishment for Blood. Studies were declared and approved by the French Ministry of Research (Declaration DC-2018-3154). All the blood samples were harvested in pre-citrated tubes of 2.7ml (BD Vacutainer®, Oakville, ON, USA). Poloxamer 188, sodium chloride, Tris-Imidazole, HEPES and the Calcium Chloride were from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Poloxamer 407 was obtained from BTC Europe (Germany). The dPBS (Gibco™) was from Thermofisher Scientific (Waltham, MA, USA). Recombinant tissue factor supplemented with synthetic phospholipid (Dade® Innovin®) was provided by Siemens Healthcare (Munich, Germany). Spectrozyme rtPA 444 was from Biomedica Diagnostics (Montreal, Canada). Plasmin and plasminogen were purchased from Enzyme Research Laboratories Ltd (Swansea, United Kingdom). The pNAPEP 1751 was from Cryopep (Montpellier, France). S-EXTEM substrates for thromboelastography and the ROTEM delta instrument were from Werfen (Le Pré Saint Gervais, France).

Drugs

rtPA (alteplase) was from Boehringer-Ingelheim (Germany), resuspended as described by the manufacturer. OptPA was produced using the GPEx® technology, proprietary technology of Catalent Biologics (Madison, United States of America). O2L-001 was prepared by the inclusion of OptPA in a solution of 17% (w:v) poloxamer 407. Briefly, an OptPA solution was precipitated by the addition of tetraglycol and gentle mixing at 4°C. After centrifugation, the supernatant was discarded, and the precipitates were resuspended in the poloxamer solution.

Whole blood clot model

Blood samples from 4 to 6 donors were received and treated on their sampling day. Briefly, samples were pooled, and the coagulation was induced by adding 2% Innovin® and 0.025M CaCl₂. To obtain old clots, they were kept overnight at 37°C. Clots were produced from 1ml or 5ml of blood. Blood clots were weighted on the morning of the treatment.

5ml clot treatment

Treatments were administered on randomly assigned clots. 400µl of the treatments (rtPA, O2L-001, PBS) were injected using a 1ml syringe with a murine catheter positioned at the core of the clot. The clots were weighed before treatment initiation and after 9h at the treatment end to assess the extent of thrombolysis over the treatment period

$$\text{Relative remaining weight} = \frac{\text{weight after treatment}}{\text{weight before treatment}} \times 100$$

5 to 6 experiments were done per condition. Means and standard deviations are plotted.

1ml whole blood incubation treatments

The treatments are performed on randomly assigned clots. Clots were treated by immersion in a 15 ml bath containing different concentrations of rtPA or PBS: (1) continuous exposure in 15ml PBS was performed as a negative control; (2) three repeated exposure of 15 minutes in a rtPA solution at 30µg/ml as a positive control to mimic repeated exposure done in the MisTIE clinical setting; (3) continuous exposure to rtPA (range : 0.001 µg/ml, 0.01µg/ml, 0.1µg/ml, 1µg/ml). The clots were weighed before treatment initiation and at different time points (1h, 3h, 5h, 7h and 24h) to estimate clot lysis.

$$\text{Relative remaining weight} = \frac{\text{weight after treatment}}{\text{weight before treatment}} \times 100$$

7 individual experiments were done. Means and standard deviations are plotted.

Rheological measurements

The thermosensitive gelation process of O2L-001 was investigated upon temperature sweeping from 4 to 40°C using a rheometer MCR102 (Anton-Paar, Graz, Austria) with the following parameters: geometry plate-plate (plates space 40mm); strain 0.1%; frequency 1%; heating rate 1°C/min. Storage (G') and loss modulus (G'') are recorded all over the temperature shift. The transition from liquid to gel is achieved when $\tan \delta = \frac{G''}{G'} = 1$. Gelation time was calculated as the time between the transition phase ($\tan \delta = 1$) and the plateau of the $\tan$ function (plateau following one-phase decay model). For each concentration, 3 individual experiments were performed. Means and standard deviations are plotted.

O2L-001 dissolution method in a flow-through cell (USP4)

O2L-001 dissolution kinetics was investigated in a dissolution system (SOTAX CE7 Smart, flow-through cell method) configured as a closed-loop system allowing the use of a fixed O2L-001 volume and use a piston pump (SOTAX CP7-35) with Off-line HPLC measurement. The experiments were done using a sample size 500 mg of O2L-001 (1 mg of protein per g of gel) in 50 mL of dissolution medium (0.9% NaCl in Buffer pH 7.4). This corresponding to a final concentration of protein (OptPA) of 10 µg/mL in the dissolution medium. OptPA was quantified in the USP4 system using an HPLC method. Briefly, the parameters were the following: C4 column Jupiter (150 x 4,6 mm, 5 µm, 300 Å); mobile phase A: 0.1% TFA in Deionized Water V/V; mobile phase B: 0.1% TFA in Acetonitrile V/V and a flow rate of 1.2 mL/min. Protein was detected at 220 nm and the expected retention time was about 8.8-9.5min. 5 individual experiments were led. This set of experiments was performed by SPS pharma services. Non-linear regression analysis was performed by SOLADIS Group. An ANOVA model with two factors (time, time²) was used to fit a non-linear quadratic regression (aX^2+bX+c equation model) until the plateau was reached. Means and standard deviations are plotted.

Thrombolytic activity

Fresh blood (300µL per assay, used within 6 hours) was studied using rotational thromboelastography (ROTEM delta, TEM®, Werfen) in the presence of rtPA and OptPA (0.6 and 0.9 µg/ml) and S-EXTEM substrate. Plasminogen activators were diluted in HEPES buffer (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM). Clotting Time (CT), Maximal clot firmness (MCF) and Clot Formation Rate (CFR) were measured to characterize and quantify the modification of the coagulation step. Lysis Onset Time (LOT; time needed for a decrease in MCF by 15%), Clot Lysis Rate (CLR) and the area under the curve (AUC) were measured to characterize and quantify thrombolysis. Analyses were performed on 5 to 7 independent donors. Means and standard deviations are plotted.

Amidolytic activity

Plasminogen activators were incubated in the presence of a chromogenic substrate (2 µM) (Spectrozyme 444 (methyl-D-cyclohexatyrosyl-glycyl-arginine paranitroaniline acetate)). The reaction was carried out at 37°C in a buffer containing 300 mM NaCl, 50 mM Tris-Imidazole

pH = 8.4 in a final volume of 200 µL. Enzymatic activity of the plasminogen activators variants was determined by measuring the increase in absorbance of the free chromophore (pNA) generated per unit time at a wavelength of 405 nm over 30 min (initial-rate-method) in a microplate reader (BIOTEK ELx 808). Analyses were performed on up to 10 different concentrations in duplicate from 5 independent experiments. Means and standard deviations are plotted.

Plasminogen activation

Plasminogen activators were incubated in the presence of Glu-plasminogen (0.25µM) and of pNAPEP 1751 (0.6mM). The reaction was carried out at 37°C in a buffer containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Imidazole pH = 8.0 in a final volume of 50 µL. Enzymatic activity of the plasmin (A_{Pln}), converted by the action of plasminogen activator on plasminogen (A_{tPA}), was determined by measuring the increase in absorbance of the free chromophore (pNA) generated per unit time at a wavelength of 405 nm over 18 hours, in a microplate reader (BIOTEK ELx 808). A_{Pln} is the first derivate of A_{tPA} determined by the calculation of the slope as a function of the time:

$$A_{Pln} = \frac{dA_{tPA}}{dt}, \text{ where } dA_{tPA} \neq 0$$

Analyses were performed on up to 6 different concentrations in duplicate for 5 independent experiments. Results are given as mean +/-standard deviation.

Statistical analysis

The normality of the residuals was confirmed before using a parametric test using the Shapiro-Wilk test. Otherwise, non-parametric tests were used. The test used for each analysis is described in the results section. Statistics were computed using GraphPad Prism version 9.1.2 (226) for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.Graphpad.com

Results:

O2L-001 a more efficient thrombolytic than regular rtPA for clot thrombolysis

Ex vivo clots were produced from a pool of human blood harvested within 24 hours (6 donors per experimentations). Overnight incubation at 37°C allows to obtain aged clots (**Figure 1**)

with measured initial weight ranging from 3.41g $\pm$ 0.39 (NaCl 0.9% – negative control) to 3.74g $\pm$ 0.34 (O2L-001 0.1mg/ml). For the following comparison, the normality of the residuals was confirmed using the Shapiro-Wilk test if not otherwise stated. Before treatments, clot weights were not different (n=6, one-way ordinary ANOVA, p-value =0.287 - **Figure 1A**). 9h after injection, rtPA 1.0mg/ml treatment (positive control) in this model induced 57.4% reduction of the relative clot weight when compared to a PBS treatment (negative control) (84.7% $\pm$ 4.0 for negative control vs. 27.3% $\pm$ 10.8 for rtPA 1.0mg/ml, one-way ANOVA followed by Sidak multiple comparison test, p-value <0.0001 - **Figure 1B**). O2L-001 treatment at 1.0mg/ml showed a higher thrombolytic efficacy when compared to rtPA 1.0mg/ml with a 21.1% reduction of the relative weight (6.2% $\pm$ 5.2 for O2L-001 1.0mg/ml, p-value =0.0002). Interestingly, two clots were completely liquefied, and 5 out of 6 clots had a final relative weight below 10%, while none of the clots treated with rtPA showed such a state of degradation at the end of the experiment. We then compared the lower concentrations of O2L-001 vs rtPA successively until a statistical effect was no more observable (one-way ANOVA followed by Sidak multiple comparison tests). O2L-001 treatment at 0.3mg/ml was still more effective than rtPA 1.0mg/ml in terms of thrombolytic activity with a 12.9% reduction of the relative weight (14.4% $\pm$ 9.8 for O2L-001 1.0mg/ml, p-value=0.0314). O2L-001 0.1mg/ml was not different from rtPA 1.0mg/ml and achieved similar clot lysis than rtPA 1.0mg/ml (mean difference was 4.6% with O2L-001 0.1mg/ml achieving 22.7% $\pm$ 5.3 clot lysis, p-value=0.7897).

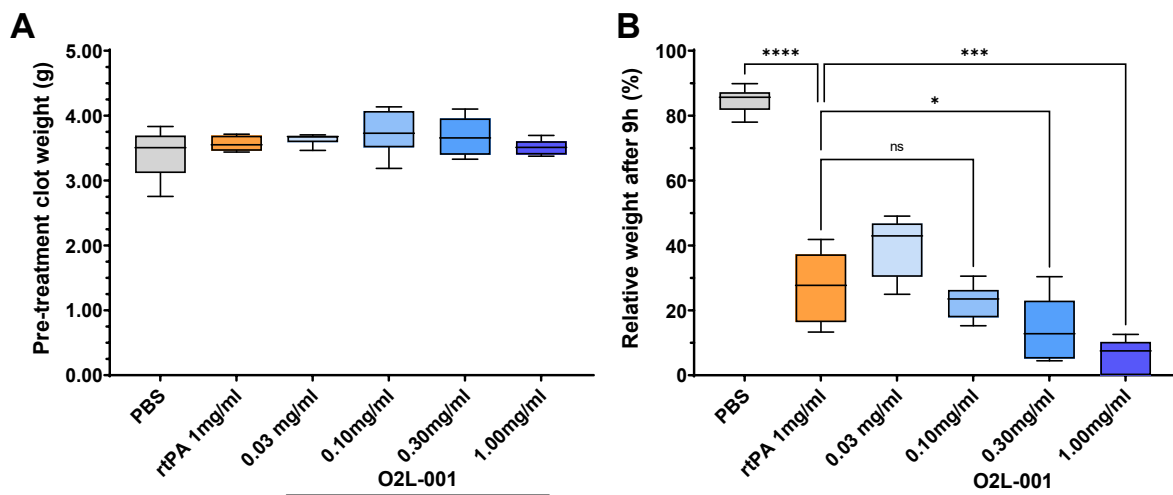


Figure 1: O2L-001 allows almost complete liquefaction of 5ml clot (<10% of the initial weight at the end of the treatment). **A:** initial weight of the clot (before treatment) following overnight coagulation at 37°C; **B,** Relative remaining weight assessed after 9 hours treatment. rtPA treatment administered to mimic the MistIE procedure (a total of 400µl at 1.00mg/ml injected over three successive shots at t=0h/ 4h and 8h) allows 57.7% clot lysis vs PBS injection while a unique injection of O2L-001 1.00mg/ml allows 21.1% more thrombolysis versus rtPA. O2L-001 0.10mg/ml were similar to rtPA in terms of thrombolytic potency. N=6. Ordinary one-way ANOVA followed by Sidak multiple comparison test; ns= non-significant; * means p-value <0.05; *** p-value <0.001; **** p-value <0.0001.

The 1.0 mg/ml rtPA condition was administered over three shots to mimic the clinical condition set up in the MistIE trial. To ensure that, in our model, multiple injections were not different from a single administration with the same rtPA quantity (**Figure 2**). Again, before treatments, clot weights were not different (n=5, one-way ordinary ANOVA, p-value= 0.8643 - **Figure 2A**). 9h after injection, the rtPA 1.0mg/ml treatment (following the MistIE clinical setup, total volume injected over 3 injections 4 hours apart) induced 53.4% reduction of the relative clot weight when compared to a PBS injection (negative control) (83.4% +/-6.5 for negative control vs 30.0% +/-4.3 for rtPA, Shapiro-Wilk test p-value = 0.0122, non parametric test, Mann-Whitney comparison test, p-value=0.0079, n=5 - **Figure 2B**). The rtPA 1.0mg/ml injected in a single shot induced 59.0% reduction of the relative clot weight and is significantly different compared to a PBS injection (83.4% +/-6.5 for negative control vs 24.4% +/-16.5 for rtPA, Mann-Whitney comparison test, p-value =0.0079, n=5). In this model, a single administration or multiple injections with the same total rtPA quantity and concentration did

not modify the thrombolytic potency of the treatment (5.6% difference, Mann-Whitney comparison test, p-value =0.1349, n=5).

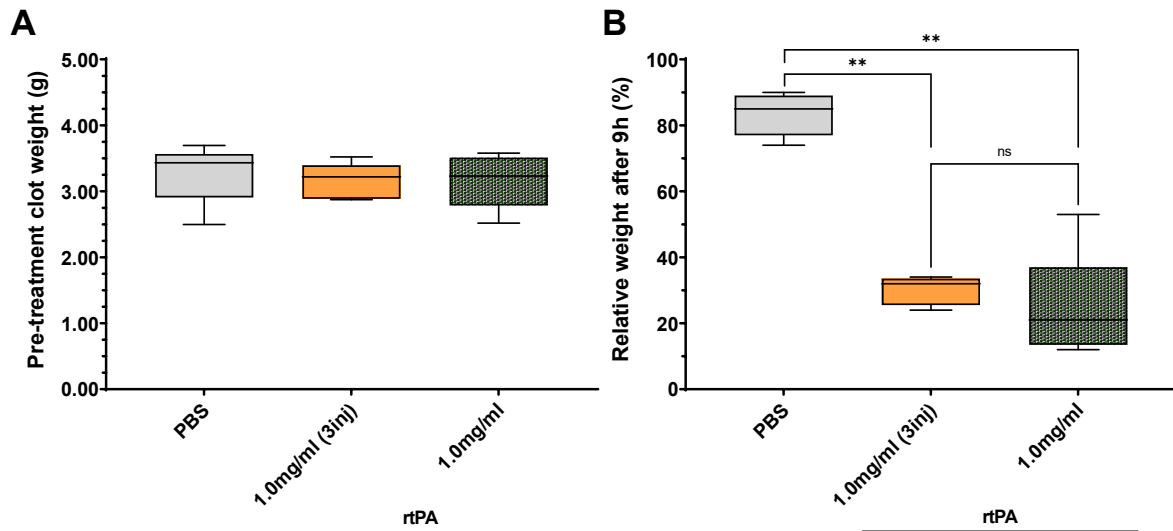


Figure 2: The delivery method of rtPA did not influence total thrombolysis after 9 hours. **A:** initial weight of the clot (before treatment) obtained after overnight coagulation at 37°C; **B:** Relative remaining weight assessed after 9 hours treatments, as a percentage of the initial weight. rtPA treatment administered to mimic the MistIE procedure (a total of 400µl at 1.00mg/ml injected over three successive shots at t=0h/ 4h and 8h) allows 53.4% clot lysis vs PBS injection while injection of rtPA in a single shot at 1.00mg/ml allows 59.0% clot lysis versus PBS. No significant difference can be seen between these two modes of injection. N=5. Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney tests; **=p-value<0.01; ns= non-significant.

Extended exposure to plasminogen activator at low concentration allows high thrombolytic activity

The 17% poloxamer 407 solution constituting O2L-001 is a thermosensitive polymer in a liquid state at 4°C and a gel at 37°C. As a gel, it degrades slowly to release the entrapped OptPA, and it increases the duration of action of the thrombolytic agent¹³. The higher efficacy of O2L-001 vs rtPA may be explained by the increased exposure to an active concentration of a thrombolytic agent.

Therefore, we investigated the minimal concentration of plasminogen activator needed to achieve a blood clot lysis and to compare the effect of this minimal concentration to repeated short exposure to a higher concentration of rtPA mimicking the clinical setup of the MistIE

trial (between exposure to rtPA, the clot was incubated in 15ml PBS). 1ml human blood clots were produced by the addition of tissue factor and calcium, clots were incubated overnight. Old clots were then immersed into PBS bath containing different concentrations of rtPA (**Figure 3A**). In the absence of rtPA, the human 1ml clot lost 20.4 +/-14.4% of its weight during the first 7 hours of treatment and up to 42.1 +/-18.5% 24 hours after the treatment initiation. Multiple exposures to the higher rtPA concentration (3 consecutive 15 min expositions to 30µg/ml rtPA 4 hours apart) led to significant thrombolysis at all the timepoints except at 24 hours when compared to the PBS control (2-way ANOVA followed by Dunnett test, n=7 at the time points 1h, 3h, 5h, 7h and 24h, the p-values were respectively p-value=0.0122, p-value=0.0203, p-value=0.0407, p-value=0.0198, p-value=0.0967-Table 1.

Table 1. Mean Difference and confidence interval between multiple rtPA exposures versus long exposure of low rtPA concentration at the different time points (Dunnett multiple comparison test to the 3x30µg/ml condition).

Dunnett's multiple comparisons tests	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Adjusted P-Value
T0			
rtPA 3x30µg/ml vs Sham	0.00		
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.001µg/ml	0.00		
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.01µg/ml	0.00		
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.1µg/ml	0.00		
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 1µg/ml	0.00		
T1			
rtPA 3x30µg/ml vs Sham	-35.7	-61.9 to -9.48	* 0.0122
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.001µg/ml	-34.0	-60.2 to -7.71	* 0.0157
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.01µg/ml	-35.3	-61.5 to -9.06	* 0.0127
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.1µg/ml	-23.9	-51.2 to 3.44	0.0918
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 1µg/ml	-24.9	-51.4 to 1.68	0.0670
T3			
rtPA 3x30µg/ml vs Sham	-40.9	-74.6 to -7.11	* 0.0203
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.001µg/ml	-40.0	-73.7 to -6.23	* 0.0231
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.01µg/ml	-37.0	-70.8 to -3.19	* 0.0330
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.1µg/ml	-20.4	-55.6 to 14.7	0.3433
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 1µg/ml	-13.1	-47.0 to 20.8	0.6466
T5			
rtPA 3x30µg/ml vs Sham	-45.0	-88.0 to -2.04	* 0.0407
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.001µg/ml	-44.1	-87.1 to -1.19	* 0.0445
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.01µg/ml	-40.6	-83.7 to 2.56	0.0653
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.1µg/ml	-23.0	-68.2 to 22.2	0.4568
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 1µg/ml	-14.1	-58.4 to 30.1	0.7984
T7			
rtPA 3x30µg/ml vs Sham	-46.6	-85.3 to -7.86	* 0.0198
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.001µg/ml	-43.8	-82.8 to -4.91	* 0.0280
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.01µg/ml	-41.3	-80.9 to -1.63	* 0.0410
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.1µg/ml	-14.6	-54.3 to 25.2	0.7159
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 1µg/ml	-8.86	-51.0 to 33.3	0.9553
T24			
rtPA 3x30µg/ml vs Sham	-32.0	-69.0 to 5.00	0.0967
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.001µg/ml	-26.8	-69.6 to 16.0	0.2903
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.01µg/ml	-24.1	-65.9 to 17.6	0.3636
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 0.1µg/ml	-6.29	-48.0 to 35.4	0.9891
rtPA 3x30µg/ml vs rtPA 1µg/ml	2.43	-35.9 to 40.8	0.9997

2-way ANOVA revealed a very strong effect of treatment (p-value =0.003) and time (p-value <0.0001) on hematoma lysis. Considering the treatment first, multiple comparison test

(Dunnett test) highlighted the absence of statistical difference between the three successive exposures of 15min 4 hours apart to rtPA, to the continuous exposure to rtPA at 0.1 or 1.0 μ g/ml for every timepoint considered (see Table 1 for mean difference, 95% confidential interval and p-value). The hypothesis of the absence of inhibition of rtPA by PAI-1 (due to the excess of rtPA in the 15ml bath versus the hematoma produced from 1ml of blood) at least for the higher concentrations of rtPA (0.1; 1.0 and 30 μ g/ml), allows to compare the global exposition of the hematoma to rtPA in this experiment (**Figure 3B**), the total area under the curve is 2.4AU, 24.0AU and 30.2AU over 24hours for the conditions 0.1 μ g/ml, 1.0 μ g/ml and 3x30 μ g/ml respectively. In other words, a 92% reduction of the exposure to rtPA led to the same thrombolysis in this experiment. The continuous exposure to the two lower concentrations of rtPA in this experimentation, rtPA 0.001 μ g/ml and rtPA 0.01 μ g/ml, were statistically different from rtPA 3x30 μ g/ml at 1h, 3h, 5h ($p=0.065$ for rtPA 0.01 μ g/ml) and 7h (**Table 1**).

Interestingly this experimental setup also highlighted the impact of time on thrombolysis ($p<0.0001$, 2-way ANOVA). The first 15min exposure to rtPA 3x30 μ g/ml has high efficacy at $t=1h$ with 37.3% reduction of hematoma weight (95% CI [11.0;63.6], $p=0.0107$), and the same extent of reduction was observed over the next 23h (74.1% reduction between T_0 and T_{24} , [39.1;109.0], $p=0.0014$), when the clot has been exposed three times to the 30 μ g/ml rtPA solution. Continuous exposure to 1 μ g/ml led to more progressive thrombolysis with only 12.4% reduction at 1h ([-0.1;25.0], $p=0.0515$), but 76.6% reduction at 24h ([49.4;104], $p=0.0003$). The thrombolytic effect is not observable from $t=7h$ for the concentrations of 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml and 3x30 μ g/ml (compared to the sham evolution between $t=7h$ and $t=24h$). As seen before, there was no significant nor biological difference between these three conditions at $t=7h$.

Thus, a therapy to liquefy a blood clot should allow sustained release of a thrombolytic agent to have continuous exposure to a concentration of at least 0.1 μ g/ml during at least 5 to 7 hours.

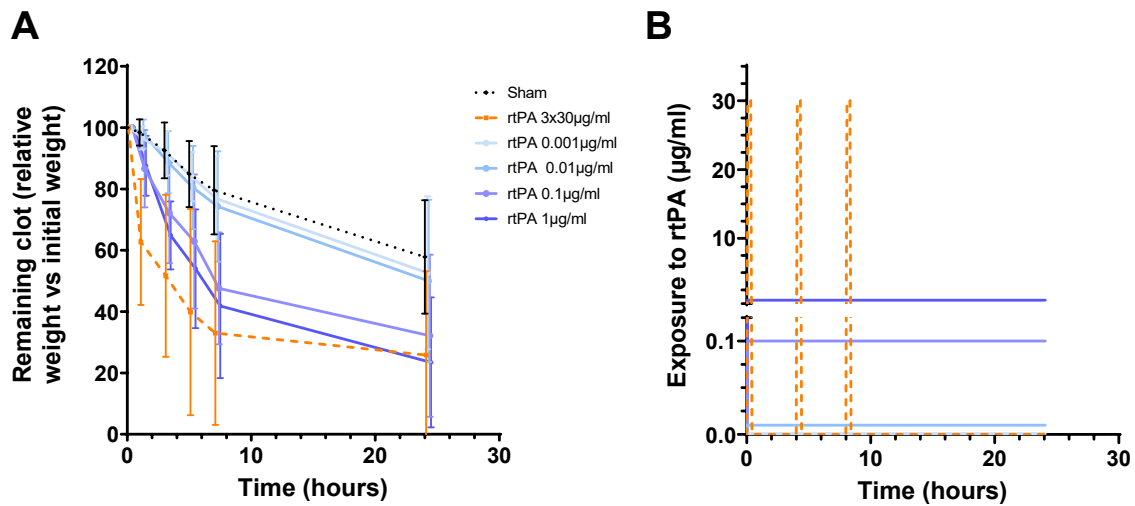


Figure 3: Relative clot weight remaining (% of initial clot weight) over time under various rtPA expositions. **A:** The results are presented as the mean $\pm$ SD for each group ($n = 7$, one missing data in the group rtPA 0.001 $\mu\text{g/ml}$). The negative control (sham – dotted line) is a PBS bath for 24h. MistIE clinical setup was mimicked by 3 successive baths of rtPA 30 $\mu\text{g/ml}$ for 15min (positive control - dashed line), each 4h apart. Arrows indicate the initiation of a 15-min incubation with rtPA 30 $\mu\text{g/ml}$ at T0, T+4h, T+8h in the positive control group. Treatments were incubate 24h for the rtPA solution ranging from 0.001 $\mu\text{g/ml}$ to 1 $\mu\text{g/ml}$ (blue lines from light 0.001 $\mu\text{g/ml}$ to dark blue 1.0 $\mu\text{g/ml}$). Data are nudged for better clarity of the SD. For better clarity, statistics were not represented in this figure. **B:** Scheme of exposition of the blood to rtPA in the different conditions tested as function of the time.

O2L-001 solution to a gel transition temperature

Based on the previous results, we then aimed to characterize the release profile of O2L-001. As described by Liu and collaborators, 18% poloxamer 407 allows 8 to 10 hours release of the protein encapsulated in the polymer¹³. Decreasing the concentration of poloxamer 407 reduces the jellification temperature and the release time¹⁴. Here, O2L-001 is composed of a 17% poloxamer 407 carriers in which OptPA is encapsulated to allows a release time inferior to 8h as detailed before (**Figure 3**). Rheological measurements were performed to calculate the solution to a gel transition temperature and the time to reach a stable gel state after reaching the transition temperature (**Figure 4**). Two different concentrations of O2L-001 (OptPA at a concentration of 0.2 mg/ml and 1 mg/ml) were analyzed to weight the concentration parameter in the solution to gel transition. As expected, O2L-001 is liquid at 4°C and until the transition temperature (loss modulus value equals the elastic modulus value,

$G''=G'$), a solid above the transition temperature, and more precisely a gel in our case (Figure 18 A-B). Computed transition temperature was 26.7°C (95% CI [26.6;26.9]) for O2L-001 1.0mg/ml and 25.8°C (95% CI [25.7;26.0]) for O2L-001 0.2mg/ml (n=3 each, simple linear regression over 21 and 15 values respectively). Decreasing the concentration by a factor 5 reduce the transition temperature of approximately 1°C. The concentration does not play a major effect on the transition temperature (**Figure 4C-D**). Taking into account that the rheometer was used with a 1°C/min slope parameter, time to reach the stable gel state (plateau observed following the one phase decay) was 1.2 min for the 1.0 mg/ml concentration (plateau = 0.1007, 95% CI [0.0939:0.1075]; 53 values analyzed, $R^2=0.999$) and 1.5 min for the 0.2mg/ml concentration (plateau = 0.1163, 95% CI [0.1087:0.12380]; 58 values analyzed, $R^2=0.999$) (**Figure 4E-F**).

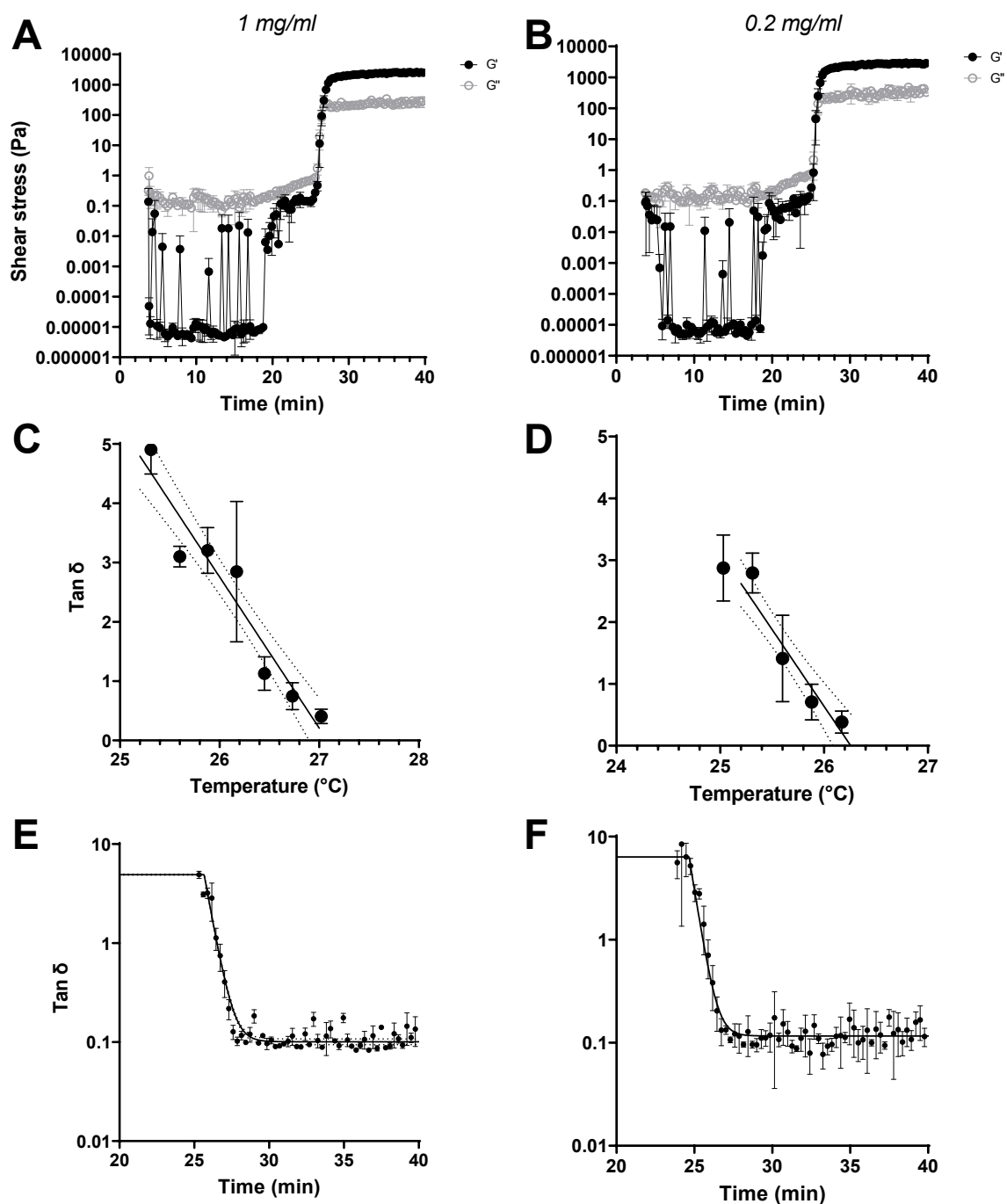


Figure 4: Rheological characteristics of O2L-001 at 0.2mg/ml and 1mg/ml concentrations. O2L-001 was studied on a rheometer at two different concentrations, 1.0mg/ml (A-C-E) and 0.2mg/ml (B-D-F). Evolution of the elastic (G') and the loss modulus (G'') parameters are described. A-B: and confirm the liquid state at 4 $^{\circ}\text{C}$ and the gel state at 37 $^{\circ}\text{C}$. C-D: Calculation of the transition temperature, when $\tan \sigma = G''/G' = 1$. E-F: Time to reach a stable gel state after crossing the transition temperature (gelation

time) was similar for the two concentrations tested, with 1.2 and 1.5min for the 1.0 and 0.2 mg/ml concentrations with a temperature rise of 1°C per min.

O2L-001 release profile

Once the gel is formed, the kinetic release of OptPA from O2L-001 1.0 mg/ml was evaluated with a flow-through cell method (USP4). After incubation at 37°C to allow jellification of the material, the dissolution medium was pumped into the cell in a close loop, and a series of 1ml harvests were proceeded at different time points to evaluate by HPLC the quantity of OptPA released. Two steps can be identified in the release of the protein of interest, with an intense release time during the first 30 min (54.6 +/-4.5% of the initial loaded dose released and 82% of the total released material) and a slow release over the next 5.5 hours (to reach a total release from the initial quantity loaded of 66.2 +/- 3.7%) (**Figure 5A**). Adjusted R² for the quadratic modelization was 0.8203 (temperature shift 70sec, volume injected 500µl approx.) and the plateau was reached at t=5.2h (dy/dt=0) in these conditions (**Figure 5B**). This experimentation confirms the previous observation that O2L-001 allows a persistent presence of active OptPA at the clot site to favour a better thrombolytic effect. The first derivative indicated a release of 1.35% of the product injected (500mg) between t=4h and t=5h.

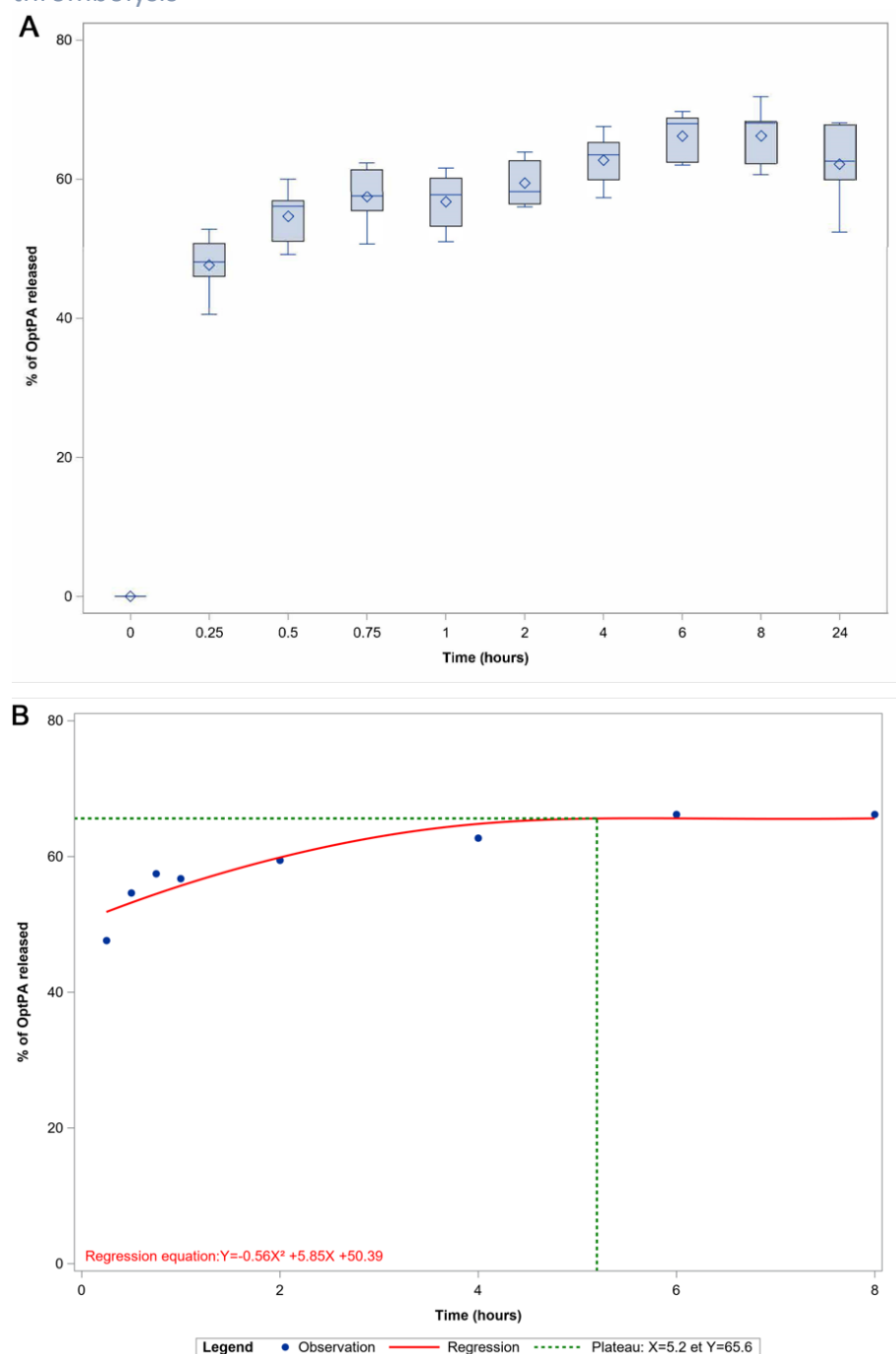


Figure 5: The release profile of OptPA from O2L-001. OptPA was quantified in the dissolution medium by HPLC. A fast release of 54.6% (SD= 4.5) of the loaded amount of OptPA was observed during the first 30min. Then, OptPA was slowly released during the next 5 hours until reaching a plateau at 66.2 % (SD=3.7). Degradation seemed to be observed between 8h and 24h.

OptPA is a safer thrombolytic agent than rtPA with similar fibrinolytic potency

O2L-001 was tailored to be administered in the brain hematoma of ICH patients. Thus, the choice of the thrombolytic agent was of utmost importance. rtPA has been highlighted in several experimental setups to be pro-neurotoxic^{15,16}. Indeed, Rhode and collaborators demonstrated in a pig model of ICH that rtPA used to decrease the hematoma size was a powerful thrombolytic agent in this condition and that rtPA also induced oedema formation, a phenomenon attributed to the interaction between rtPA and the NMDA receptors^{8,17}. OptPA is a novel rtPA variant with a safer profile, reduced amidolytic activity, and reduced pro-neurotoxicity¹². As O2L-001 is designed to be injected in intracerebral, OptPA was preferred to rtPA for better therapeutics benefits. OptPA was produced from a CHO cell line (Catalent Biologics, Madison, USA) in this publication, and we characterized the recombinant protein. We thus compared the thrombolytic activity of OptPA vs rtPA (**Figure 6**), as well as their enzymatic activity, on a plasminogen-like substrate and their natural substrate, plasminogen (**Figure 7**).

OptPA and rtPA did not affect the coagulation cascade, with no effect of the drugs nor the concentrations on the clotting time (time from test initiation until an amplitude of 2 mm is reached), maximum clot firmness and clot formation rate. Three parameters were recorded to analyze the two plasminogen activators effects on thrombolysis. The first one is the lysis onset time, defined as the time to reach 85% of the maximum clot firmness. The second one is the clot lysis rate, and the third parameter is the area under the curve that relates to the global behaviour of the thrombolytic agent. As expected, ordinary two-way ANOVA also highlighted the strong effect of concentration on the lysis onset time (49.7% of the total variation, $p < 0.0001$), as well as an effect of the drug on the initiation of thrombolysis (13.0% of the total variation, $p = 0.0156$) (**Figure 6A**). Nevertheless, multiple comparison using Sidak test did not reveal any statistical difference between rtPA and OptPA neither at 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (320sec difference, 1467.0sec $\pm$ 194.4 for rtPA, $n=7$, and 1787.0sec $\pm$ 333.0 for OptPA, $n=5$, $p=0.1040$) nor at 0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (247sec difference, 948.4sec $\pm$ 149.3 for rtPA, $n=7$, and 1195.5sec $\pm$ 372.5 for OptPA, $n=6$, $p=0.2092$). The clot lysis rate parameter showed that neither the concentration (11.0% of the total variation, $p=0.1315$) nor the drug (0.1% of the total variation, $p=0.8909$) impacted this parameter and that there was no statistical difference between the two drugs at the concentrations tested (2-way ANOVA followed by Sidak multiple comparison test, $n=7$ for rtPA and 5 for OptPA) (**Figure 20B**). Finally, as the area under the curve is a global

representation of the behaviour of the clot during coagulation and then thrombolysis, there was no difference between OptPA and rtPA during coagulation and limited difference only at the initiation of the thrombolysis (LOT), we were not able to discriminate the two drugs with this parameter (p-value for the concentration 0.6 μ g/ml and 0.9 μ g/ml are 0.8671 and 0.7021). OptPA and rtPA showed similar thrombolytic activity (Figure 20C).

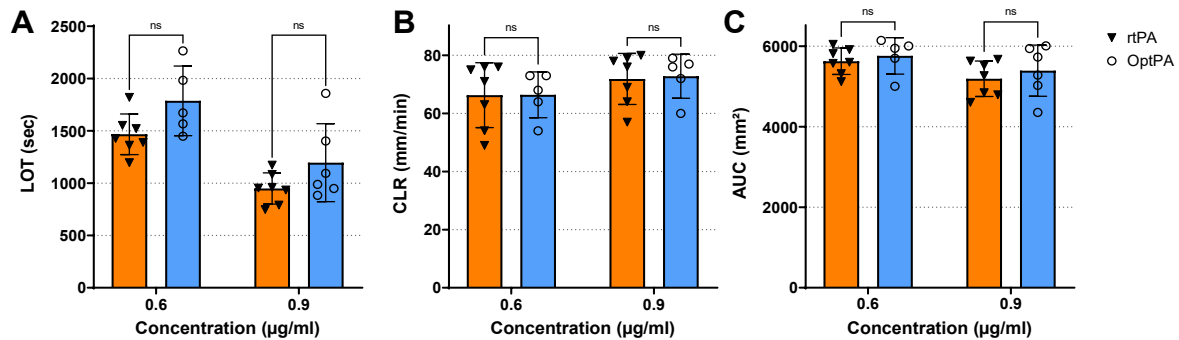


Figure 6: Comparative thrombolytic parameters of rtPA and OptPA. Thrombolysis parameters including Lysis Onset Time (LOT - **Panel A**), Clot Lysis Rate (CLR - **Panel B**) for both drugs, OptPA and rtPA at 0.6 μ g/ml and 0.9 μ g/ml. The area under the curve considers the formation and the thrombolysis of the clot (**Panel C**). $n=5-7$ individual experiments. Two-way ANOVA followed by Sidak multiple comparison tests.

As tPA plays direct and indirect multiple roles in the central nervous system^{18,19} with plasmin-dependent pathway, we measured the enzymatic activity of OptPA vs rtPA and its ability to activate plasminogen into plasmin (**Figure 7**). In the absence of fibrin, OptPA showed a significantly reduced ability to cleave Spectrozyme® rtPA, a chromogenic substrate that mimics plasminogen, compared to rtPA in the range of concentration tested. V_{max} as a function of the quantity of protein followed a linear regression model (linear regressions, slope and 95% confidence intervals are: rtPA 19.73 10^{-3} OD/min/ μ g [18.87 10^{-3} ;20.59 10^{-3}] and OptPA 7.07 10^{-3} OD/min/ μ g [6.56 10^{-3} ;7.59 10^{-3}], $n=5$ individual experiments, $p<0.0001$, F test). Relative activity of OptPA adjusted to the concentration was 35.5% $\pm$ 3.5 of rtPA activity (normalized to 100% $\pm$ 10.3, $p<0.0001$, two-tailed t-test following Shapiro-Wilk normality test).

The capacity of rtPA and OptPA to activate plasminogen into plasmin, known to be involved in bleeding events, by the gelatinase activation (MMP)^{20,21}, was then recorded. Plasmin

cleaved the pNAPEP substrate, but neither tPA and OptPA alone nor plasminogen did. From the absorbance recorded at 405nm, the first derivative was computed to establish plasmin activity. Linear regression of $V_{\max}$ plasmin activity as a function of plasminogen activator concentration confirmed the difference between rtPA and OptPA to trigger plasminogen to plasmin conversion, with OptPA having a remarkable lower capability (slope and 95% CI are: rtPA $1.9 \cdot 10^{-3} \text{OD/min/nM}$ [$1.6 \cdot 10^{-3}; 2.2 \cdot 10^{-3}$] and OptPA $0.3 \cdot 10^{-3} \text{OD/min/nM}$ [$0.1 \cdot 10^{-3}; 0.5 \cdot 10^{-3}$], $n=5$; 6 and 3 concentrations tested for rtPA and OptPA respectively, $p=0.0003$; F test). The normalization of these data showed that the rtPA and OptPA means were $100\% \pm 12.1$ and $15.6\% \pm 4.7$ respectively, ($n=5$, $p<0.0001$, two-tailed t-test following Shapiro-Wilk normality test).

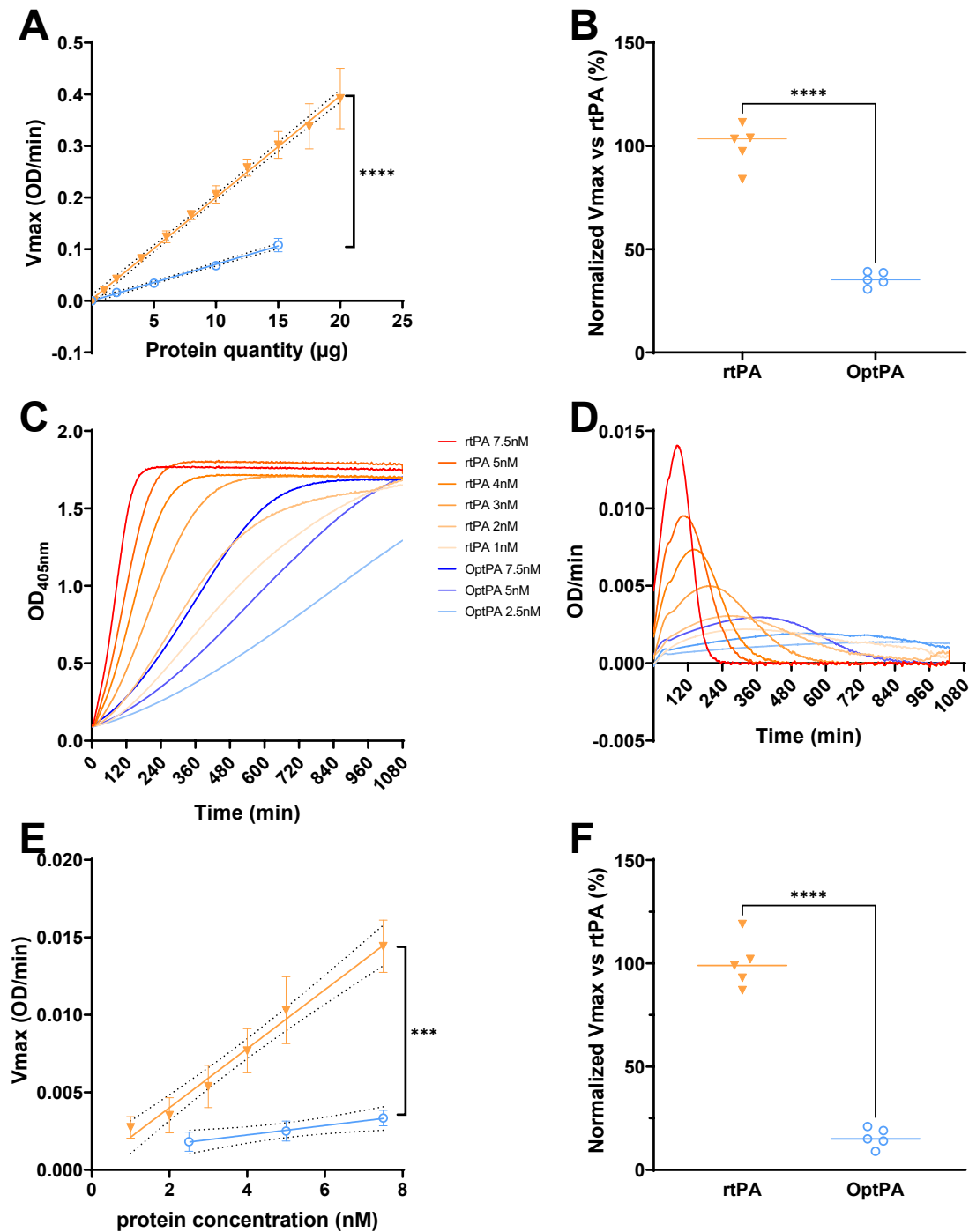


Figure 7: OptPA showed a lower enzymatic activity and subsequently lower capacity to activate produce plasmin in the absence of fibrin. **A:** The amidolytic (proteolytic activity) of OptPA and rtPA is expressed as the maximal velocity (optical density per min) of tested substances (10 and 4 concentrations were tested for each independent experiment for rtPA and OptPA, respectively, $n=5$). In the absence of fibrin, OptPA and rtPA had linear activity and increased activity with the wells concentration (95% confidence intervals are plotted). OptPA showed a substantial reduction of its amidolytic activity vs rtPA (F test) nevertheless. **B:** Normalized data highlighted a 64.5% reduction of

*the amidolytic activity of OptPA vs rtPA (two-tailed t-test). **C-D:** The ability of OptPA and rtPA to produce plasmin from plasminogen is expressed as the maximal velocity (optical density per min) of tested substances (6 and 3 concentrations were tested for each independent experiment for rtPA and OptPA, respectively, n=5). **E:** In the absence of fibrin, OptPA and rtPA had linear activity and increased activity with the wells' concentration (95% confidence intervals are plotted). OptPA showed a substantial reduction of its capacity to activate plasminogen into plasmin vs rtPA (F test). **F:** Normalized data highlighted an 84.4% reduction of the amidolytic activity of OptPA vs rtPA (two-tailed t-test).*

Discussion

O2L-001 is a new thrombolytic agent consisting of a tissue plasminogen activator variant with a safer profile, entrapped in a sustained-release technology that allows higher thrombolytic efficacy.

The MisTIE program offers a strong proof of concept that reducing the mass effect by draining the blood out of the brain through a catheter (thanks to the action of a thrombolytic agent) was associated with a lower risk of disability in patients^{5,6}. In the MisTIE trials, a recombinant tissue plasminogen activator was used, the gold-standard thrombolytic agent and the only drug approved in ischemic stroke. MisTIE 3 did not improve the proportion of patients who achieved a good response 365 days after intracerebral hemorrhage. This lack of effect may be explained by three factors: (i) an insufficient thrombolytic effect of rtPA that led to the scheme of administration of 3 injections per day up to 3 days until the target end of treatment hematoma volume was reached^{5,10}; (ii) asymptomatic bleeding events following rtPA injection as the consequence of pro-bleeding factor generation such as plasmin or MMP that lowered the net balance of blood drainage (+24% asymptomatic brain bleeds within 72 h after the last dose in the MisTIE group)^{20,21}; (iii) potential edema formation associated with the use of rtPA and its interaction with the NMDA receptors^{15,16}. While this pro-neurotoxic effect of rtPA has never been highlighted in patients, data obtained from ICH in pigs suggest that such side effects should not be waived and is certainly a component of the global clinical outcome^{7,8}.

In this report, we showed (i) increased thrombolytic activity of O2L-001 as demonstrated in human blood clots due to extended exposure to the thrombolytic agent (5 out of 6 human blood clots were entirely liquefied after 9h treatment vs none of the blood clots treated with rtPA); (ii) lower and sufficient active concentration of OptPA at the hematoma site favoured by the slow-release technology and an active thrombolytic agent that showed lower enzymatic and plasminogen activation capacity outside of the fibrin matrix. Combining both lower concentrations of OptPA and the enzymatic profile of OptPA are two crucial elements to limit symptomatic and asymptomatic bleeding. Finally, to cover the above limitation (iii), we used OptPA, which showed in previous publications to have limited NMDA pro-neurotoxicity versus rtPA, as a consequence of a point mutation in the kringle 2 domain¹². The data reported in this manuscript produced converging evidence that O2L-001 should be a

very attractive therapeutic solution for hemorrhagic stroke, the drug developed being specifically tailored to answer all the limitations observed in the MistIE trial with rtPA

In this paper, we emphasized the importance of blood exposure to plasminogen activators to achieve efficient thrombolysis. Interestingly, data obtained with the incubated 1ml blood clots strongly correlates with the previous report regarding the minimal concentration needed to achieve substantial thrombolysis, especially the work of Bonnard and collaborators ²². The blood clot exposition to concentrations beyond 0.1 µg/ml (approx. 1.5nM in their report) leads to a strong thrombolysis effect while below 0.01µg/ml (<0.35nM in their report), no apparent thrombolytic activity is observed. Our work also showed that, in this model, increasing the thrombolytic agent concentration beyond 0.1µg/ml (and up to 1µg/ml) does not promote higher thrombolytic activity, as a consequence of the limiting step that are binding, activation, desorption of both tPA and plasminogen on the fibrin matrix ^{23–25}. Increasing the concentration of plasminogen activator is thus not an answer to achieve more thrombolysis. Secondly, the half-life activity of rtPA injected in a blood clot was estimated to be in the range of 15 to 30 minutes by Keric and collaborators ¹⁰. Taking these two pieces of information together, the strategy to extend the presence of the thrombolytic agent using a sustained-release technology explains the increased thrombolytic efficacy of O2L-001 compared to rtPA, knowing that both OptPA and rtPA displayed similar thrombolytic activity.

Our findings are in the range of other works with the 17% poloxamer 407 solutions, as we mentioned the sustained-release technology. Previous publications reported an erosion of the jellified poloxamer 407 in water content, with up to 9h release of the entrapped molecule of interest in a preparation containing 18% poloxamer 407 and 1% poloxamer 188 ¹³. Additional investigations are needed to establish the role of the volume and the concentration of the drug sample on the release of active OptPA to fit our therapy to larger hematoma better.

Another exciting result we had in this report is the time needed to achieve biologically significant thrombolysis. Indeed, hematoma had to be exposed during a time window of 5 to 9 hours in our experiments to achieve significant thrombolysis of large blood clots (1ml to 5ml), whatever the thrombolysis profile followed, long exposure or short bursts exposure several hours apart.

We also faced several limitations in our study. First, we used mainly an *ex vivo* model of hematoma to evaluate the thrombolytic efficacy of O2L-001. The underlying reasons for our

choice were the species specificity ²⁶, as we were testing human thrombolytic agents and the potential translation to the human pathology with larger hematoma in comparison to what can be achieved *in vivo*, with hematomas between 1 or 2 ml in a pig model ^{27,28} where it was possible to produce 5 ml hematoma *ex vivo*. Secondly, we induce clotting with tissue factor and calcium chloride to mimic the extrinsic pathway. The intrinsic pathway was not involved in our model, while it may have a role in an *in vivo* ICH model. Finally, larger hematoma, up to 30 ml to mimic the size of the hematoma in ICH patients, may be the next step to evaluate the impact of the concentration and volume to favour successful transfer in the clinic.

Acknowledgment

We want to thank Prof. Rita Van Bever and her team for her support on the rheological study. This work was supported in part by the PIA-3 funding (Plan d'Investissement d'Avenir) and by the ANRT (Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie) with the CIFRE program.

References

1. Feigin VL, Krishnamurthi R V., Parmar P, Norrving B, Mensah GA, Bennett DA, Barker-Collo S, Moran AE, Sacco RL, Truelsen T, et al. Update on the global burden of ischemic and hemorrhagic stroke in 1990-2013: The GBD 2013 study. *Neuroepidemiology*. 2015;45:161–176.
2. Luengo-Fernandez R, Violato M, Candio P, Leal J. Economic burden of stroke across Europe: A population-based cost analysis. *Eur. Stroke J*. 2019;239698731988316.
3. Steiner T, Al-Shahi Salman R, Beer R, Christensen H, Cordonnier C, Csiba L, Forsting M, Harnof S, Klijn CJM, Krieger D, et al. European Stroke Organisation (ESO) guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage. *Int. J. Stroke Off. J. Int. Stroke Soc*. 2014;9:840–855.
4. Hemphill JC, Greenberg SM, Anderson CS, Becker K, Bendok BR, Cushman M, Fung GL, Goldstein JN, Macdonald RL, Mitchell PH, et al. Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2015;46:2032–2060.
5. Hanley DF, Thompson RE, Rosenblum M, Yenokyan G, Lane K, McBee N, Mayo SW, Bistran-Hall AJ, Gandhi D, Mould WA, et al. Efficacy and safety of minimally invasive surgery with thrombolysis in intracerebral haemorrhage evacuation (MISTIE III): a randomised, controlled, open-label, blinded endpoint phase 3 trial. *Lancet*. 2019;
6. Awad IA, Polster SP, Carrión-Penagos J, Thompson RE, Cao Y, Stadnik A, Money PL, Fam MD, Koskimäki J, Girard R, et al. Surgical Performance Determines Functional Outcome Benefit in the Minimally Invasive Surgery Plus Recombinant Tissue Plasminogen Activator for Intracerebral Hemorrhage Evacuation (MISTIE) Procedure. *Clin. Neurosurg*. 2019;84:1157–1168.
7. Thiex R, Weis J, Krings T, Barreiro S, Yakisikli-Alemi F, Gilsbach JM, Rohde V. Addition of intravenous N-methyl-D-aspartate receptor antagonists to local fibrinolytic therapy for the optimal treatment of experimental intracerebral hemorrhages. *J. Neurosurg*. 2007;106:314–320.
8. Keric N, Maier GS, Samadani U, Kallenberg K, Dechent P, Brueck W, Heuer J, Rohde V. Tissue Plasminogen Activator Induced Delayed Edema in Experimental Porcine Intracranial Hemorrhage: Reduction with Plasminogen Activator Inhibitor-1 Administration. *Transl. Stroke Res*. [Internet]. 2012 [cited 2019 Mar 11];3:88–93. Available from:

<http://link.springer.com/10.1007/s12975-012-0188-3>

9. Fuchs HE, Berger H, Pizzo S V. Catabolism of human tissue plasminogen activator in mice. *Blood* [Internet]. 1985;65:539–544. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V65.3.539.539>
10. Keric N, Masomi-Bornwasser J, Müller-Werkmeister H, Kantelhardt SR, König J, Kempfski O, Giese A. Optimization of Catheter Based rtPA Thrombolysis in a Novel In Vitro Clot Model for Intracerebral Hemorrhage. *Biomed Res. Int.* [Internet]. 2017 [cited 2018 Nov 14];2017:1–8. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/5472936/>
11. Verstraete M, Bounameaux H, de Cock F, Van de Werf F, Collen D. Pharmacokinetics and systemic fibrinolytic effects of recombinant human tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1985;235:506–512.
12. Goulay R, Naveau M, Gaberel T, Vivien D, Parcq J. Optimized tPA: A non-neurotoxic fibrinolytic agent for the drainage of intracerebral hemorrhages. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2017;0271678X17719180.
13. Liu Y, Yang F, Feng L, Yang L, Chen L, Wei G, Lu W. In vivo retention of poloxamer-based in situ hydrogels for vaginal application in mouse and rat models. *Acta Pharm. Sin. B.* 2017;7:502–509.
14. Nie S, Hsiao WW, Pan W, Yang Z. Thermoreversible pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: In vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *Int. J. Nanomedicine.* 2011;6:151–166.
15. Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat. Med.* 1998;4:228–231.
16. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* 2001;7:59–64.
17. Thiex R, Küker W, Müller HD, Rohde I, Schröder JM, Gilsbach JM, Rohde V. The long-term effect of recombinant tissue-plasminogen-activator (rt-PA) on edema formation in a large-animal model of intracerebral hemorrhage. *Neurol. Res.* 2003;25:254–262.
18. Mehra A, Ali C, Parcq J, Vivien D, Docagne F. The plasminogen activation system in neuroinflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2016;1862:395–402.

19. Kruithof EKO, Dunoyer-Geindre S. Human tissue-type plasminogen activator. *Thromb. Haemost.* 2014;112:243–254.
20. Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, Collen D, Lijnen HR. Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J. Thromb. Haemost.* 2007;5:1732–1739.
21. Makowski GS, Ramsby ML. Binding of latent matrix metalloproteinase 9 to fibrin: Activation via a plasmin-dependent pathway. *Inflammation.* 1998;22:287–305.
22. Bonnard T, Law LS, Tennant Z, Hagemeyer CE. Development and validation of a high throughput whole blood thrombolysis plate assay. *Sci. Rep.* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jan 14];7:2346. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-02498-2>
23. Piebalgs A, Gu B, Roi D, Lobotesis K, Thom S, Xu XY. Computational Simulations of Thrombolytic Therapy in Acute Ischaemic Stroke. *Sci. Rep.* 2018;8.
24. Anglés-Cano E. Overview on fibrinolysis: Plasminogen activation pathways on fibrin and cell surfaces. *Chem. Phys. Lipids* [Internet]. 1994 [cited 2021 Jun 11];67–68:353–362. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8187235/>
25. Husain SS, Hasan AAK, Budzynski AZ. Differences between binding of one-chain and two-chain tissue plasminogen activators to non-cross-linked and cross-linked fibrin clots. *Blood* [Internet]. 1989 [cited 2021 Jun 11];74:999–1008. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2502209/>
26. Flight SM, Masci PP, Lavin MF, Gaffney PJ. Resistance of porcine blood clots to lysis relates to poor activation of porcine plasminogen by tissue plasminogen activator. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2006;17:417–420.
27. Xi G, Wagner KR, Keep RF, Hua Y, de Courten-Myers GM, Broderick JP, Brott TG, Hoff JT. Role of blood clot formation on early edema development after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 1998;29:2580–6.
28. Rohde V, Rohde I, Thiex R, Ince A, Jung A, Dückers G, Gröschel K, Röttger C, Küker W, Müller HD, et al. Fibrinolysis therapy achieved with tissue plasminogen activator and aspiration of the liquefied clot after experimental intracerebral hemorrhage: Rapid reduction in hematoma volume but intensification of delayed edema formation. *J. Neurosurg.* 2002;97:954–962.

14 Article 2: "*tPA-NMDAR signaling blockade reduces the incidence of intracerebral aneurysms*"

Les anévrismes intracérébraux sont une dilatation pathologique des artères cérébrales, dont leur rupture engendre des hémorragies sous-arachnoïdiennes avec de lourdes conséquences sur la morbidité et la mortalité des patients. Malgré qu'il n'existe pas encore de consensus sur les mécanismes impliqués dans leur formation et rupture, certains facteurs ont été identifiés comme étant cruciaux dans cette pathologie. Tels que l'inflammation, le remodelage de la matrice extracellulaire et les contraintes de cisaillement provoquées par le flux sanguin. Nous avons précédemment identifié, dans un modèle murin d'anévrisme intracrânien, l'implication du tPA dans cette pathologie. L'étude présentée ici a pour but de mieux comprendre par quel mécanisme le tPA est impliqué dans cette pathologie. Pour cela, nous avons utilisé le même modèle murin d'anévrisme intracrânien combiné à plusieurs approches telles que la transfection hydrodynamique de différents variants du tPA ainsi qu'une d'une inhibition pharmacologique. Le suivi des anévrismes *in vivo* a été fait utilisant l'imagerie par résonance magnétique. Les mutants choisis dans pour cette étude ont été délétés d'un domaine ou d'une fonction pouvant être impliqué dans cette pathologie. Le tPA $\Delta K2$, est un tPA délété de son domaine Kringle 2. Ce dernier est impliqué dans l'interaction du tPA au récepteur NMDA (Nicole et al. 2001) qui dans les cellules endothéliales est lié à la neuroinflammation (Macrez et al. 2016; Reijerkerk et al. 2008). Le deuxième mutant, le tPA ΔF , un tPA dépourvu de son domaine Finger. Ce dernier est responsable de l'interaction du tPA avec le récepteur LRP, dont l'activation a été montrée comme étant impliquée dans l'ouverture de la barrière hématoencéphalique (Yepes et al. 2003) et comme jouant un rôle important dans la protection de l'intégrité de la vasculature et contre la formation des anévrismes (Boucher 2003; Muratoglu et al. 2013). Le dernier mutant est le tPA S478A, il s'agit d'un tPA non protéolytique. L'activité protéolytique du tPA est impliquée dans la transformation du plasminogène en plasmine. Elle a été pensée comme impliquée dans cette pathologie par son action sur le remodelage de la matrice extracellulaire. Nos résultats dans cette étude ont montré que l'axe endovasculaire tPA-NMDAR est impliqué dans la formation et dans la rupture des anévrismes. De ce fait, l'utilisation d'un anticorps monoclonal capable de bloquer l'activation du récepteur NMDA dépendant du tPA montre une diminution de l'incidence des

anévrismes. Les résultats présentés ici donnent donc de nouvelles pistes sur la physiopathologie des anévrismes intracrâniens en démontrant l'implication de l'axe tPA-NMDA. De manière également intéressante, nos résultats montrent que l'utilisation d'un anticorps ciblant ces mécanismes pourrait être utile dans le traitement de cette pathologie.

Cet article a été soumis et peut être modifié avant sa publication.

tPA-NMDAR signaling blockade reduces the incidence of intracerebral aneurysms

Estelle R Louet^{1,3}, MSC; Cyrille Orset¹, PhD ; Jerome Parcq³, PhD ; Daniel F. Hanley, MD⁴ ; Denis Vivien^{1,2 *}, PhD.

¹ Normandie Univ, UNICAEN, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), 14000 Caen, France.

² Department of clinical research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, Avenue de la côte de Nacre, Caen, France.

³ Op2Lysis SAS, GIP Cyceron, Boulevard H Becquerel, 14000 Caen, France

⁴ Division of Brain Injury Outcomes, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA

Corresponding author (*): Prof. Denis Vivien, PhD, Normandie Univ, UNICAEN, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP CYCERON, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Bvd Becquerel, BP 5229, 14074 Caen Cedex, France; Tel: + 33 2 31470166; Fax: + 33 2 31470222; E-mail: vivien@cyceron.fr

Abstract

Objectives: Intracranial aneurysms are pathological dilatations that affect the cerebral arteries, leading to devastating intracranial hemorrhages. Although the mechanisms underlying the formation and rupture of intracranial aneurysms are still unclear, some factors have been identified as critical in controlling the vascular remodeling associated with intracranial aneurysms. In a preclinical model, we have previously proposed the implication of the vascular serine protease, tissue-type Plasminogen Activator (tPA), as one of these players. The purpose of the present study was to understand the mechanism(s) by which tPA could be implicated in this pathology.

Methods: Our aims were addressed by using a murine model of IA combined with hydrodynamic transfections of various tPA mutants, pharmacology, and *in vivo* magnetic resonance brain imaging.

Results: Our results show that the endovascular tPA-NMDAR axis is implicated in IA formation and rupture. Accordingly, the use of a monoclonal antibody capable of blocking tPA-dependent endothelial NMDAR signaling (Gluonomab®) decreases the rate of intracranial aneurysm formation and rupture.

Interpretation: The present study gives new insights into the pathophysiology of IA by demonstrating that tPA-dependent endothelial NMDAR signaling could be involved. Also of interest, the present data propose that a monoclonal antibody injected intravenously to target this process, Gluonomab®, could be a useful therapeutic candidate for this devastating disease.

Introduction

Intracranial aneurysms (IA) are cerebral arterial malformations with a prevalence of 3%–5% in the general population¹. The majority of IA remain asymptomatic until their rupture, which is the most common cause of spontaneous subarachnoid hemorrhage, a consequence with high mortality and disability rates². However, the management of unruptured aneurysms is still controversial. Only aneurysms with a higher risk of rupture are treated, either by surgical clipping or endovascular coiling. Aneurysms with a lower risk of rupture are kept under radiological surveillance. Therefore, understanding the biology of this pathology is crucial to the development of a better strategy for patient management³.

Despite the identification of several factors implicated in the pathogenesis of IA, the exact mechanisms leading to their formation and rupture remain unclear. It appears that, in response to the conjunction of a high wall shear stress (WSS) and a positive gradient in this WSS, endothelial cells will express a proinflammatory phenotype³. In parallel, proteases also increase in response to the accumulation of hemodynamic and proinflammatory factors^{4–8} caused by the lower blood velocity, the stagnation of blood elements, platelets and monocyte adhesion. Vascular smooth muscle cells also express a proinflammatory phenotype characterized by a loss of contractile elements and collagen followed by their migration into the vessel wall^{9,10}. Once the inflammatory cells have infiltrated the vessel wall, the internal elastic lamina is degraded, leading to growth of the aneurysm³. If the vessel wall does not adapt to the increasing wall tension by producing more collagen and remodeling the extracellular matrix fibers in the direction of the blood flow, the wall becomes thinner, promoting the risk of aneurysm rupture^{3,11}.

We previously reported that vascular tissue-type plasminogen activator

(tPA) promotes IA formation¹². tPA is a serine protease expressed and released by endothelial cells¹³. tPA is known to enhance inflammatory processes and extracellular matrix degradation by activating metalloproteases (MMP) by plasmin-dependent and/or independent mechanisms^{14,15}. Both phenomena are associated with the generation of IA⁹.

In the present study, we investigated how tPA may influence IA formation and rupture, using a murine model of elastase-induced IA combined with hydrodynamic transfection of various tPA mutants and *in vivo* magnetic resonance brain imaging. Our results obtained with different tPA mutants revealed that the endovascular tPA-NMDAR axis is implicated in IA formation and/or rupture. Accordingly, endothelial cells in the brain have been reported to express NMDAR, activated by tPA triggering Ca^{2+} -independent metabotropic activity, increasing blood brain barrier permeability and inflammation^{16,17}. Therefore, we demonstrated that animals treated intravenously with Glunomab®, a monoclonal antibody that prevents tPA-dependent endothelial NMDAR signaling, developed significantly fewer aneurysms with less rupture. Altogether, these data open new avenues for pharmacological treatment of IA in humans.

Material and Methods

Wild type and transgenic mice

Animals were kept in a temperature-controlled room (21 ± 1 °C) with a 12-h/12-h light/dark cycle and given food and water *ab limitum*. Animal care and manipulation complied with recommendations issued by the French and European guidelines for the care and use of laboratory animals (European directive 2010/63/UE) and were authorized by the ethical committee (authorization n° 3855). All experiments were performed following the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk). In the tPA null mice (tPA-null), the third exon of the gene PLAT is excised from the C57B16/129 background, leading to the expression of a nonfunctional protein. All the tPA null mice and their Wild type littermates (tPA Wt) were provided by Caen Université Biological Resources department (CURB - Université de Caen, Normandie, France).

Generation of P-Live plasmids

Plasmids were generated by inserting the coding sequence for rat tPA or rat tPA mutants under the control of the mouse hepatocyte-specific promoter (P-Live plasmid)¹⁸. Three different tPA mutants were tested, a tPA with a deletion of its Kringle 2 domain (tPA Δ K2), another with a deletion of its finger domain (tPA Δ F), and a non-proteolytic tPA (tPA S478A). The tPA Δ K2 is a tPA with a deletion of the Kringle 2 domain, generated as described in Parcq et al. (2013). The tPA Δ F is a tPA with a deletion of the finger domain, generated as described in Cassé et al. (2012). The tPA S478A is a recombinant tPA mutant in which the serine in the active site was substituted by an alanine (residue 478) by site-directed mutagenesis. A control plasmid (P-Live tPA Wt) was also generated using Wild type rat tPA.

Hydrodynamic transfection

Hydrodynamic transfections were previously demonstrated to allow overexpression of tPA and its mutants in the bloodstream 24 h after hepatic transfection^{12,21}. The animals were transfected with 100 μ g of P-Live plasmids containing the appropriate cDNA, using a high volume of saline solution (corresponding to 10% of the body weight) injected into the tail vein in less than 10 sec as previously described²¹. All the transfections were performed 24 h before the induction of intracranial aneurysms.

The presence of active and uncomplexed plasmatic tPA or tPA mutants were tested by zymography assays following an SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) performed from plasma samples harvested 7 days after the hydrodynamic transfections.

Induction of intracranial aneurysm

Intracranial aneurysms were induced as described in Hashimoto 2006 and Labeyrie et al. 2017 The animals were first deeply anaesthetized with isoflurane 5% and maintained at 2% in a 70%/30% gas mixture of N₂O/O₂ during the surgery. Next, an analgesic coverage was performed by subcutaneous injection of buprenorphine solution 0.02 mg/ml given at 0.1 mg/kg of animal body weight, followed by stereotaxic injection of 2.5 µL of elastase in the right basal cisterna (38 mU of elastase per animal diluted in saline 0.9%, Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France). After the injection, an osmotic pump previously filled with angiotensin II (800 µg in 90 µl saline 0.9%, Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France) was implanted subcutaneously (p1001, Alzet®, Dricet Corporation, Cupertino, USA), allowing a sustained delivery of angiotensin II during a period of 14 days (**Figure 1A**).

Intravenous antibody injection

Intravenous injections of Glunomab® and its control antibody were performed 4h after aneurysm induction. The animals were randomly assigned to experimental groups. They were sedated with isoflurane 5% in a 70%/30% gas mixture of N₂O/O₂ for 2 min. The injections were performed in the tail vein as a bolus with a hypodermic syringe (160µg in 200µl for each antibody).

MRI analysis

Experiments were performed with a Pharmascan 7T/12 cm system using surface coils (Bruker) in anaesthetized mice. A T2*-weighted sequence was used to detect intracranial hemorrhages. In addition, a 3-dimensional T1 contrast-enhanced weighted (3D-T1-GE-W) sequence after intra-peritoneal gadolinium injection (Gadovist 1 mg/kg; Guerbet) was performed to visualize aneurysms.

Animal follow-up and parameters studied

The severity of the pathology was assessed with respect to the following parameters: the onset of aneurysm ruptures, the number of aneurysms per animal, the hemorrhage volumes, and the

occurrence of ruptured and unruptured aneurysms. The onset of aneurysm ruptures was estimated during animal follow-up over 20 days. Animals were observed and weighed daily for the detection of a potential aneurysm rupture. Animals were considered symptomatic if they fulfilled the criteria of a significant weight loss (10% body weight or more in 24h) and/or other observatory criteria (listed in order of severity): the aspect of the fur (lack of grooming), the lack of response to whisker stimulation, lack of sociability, lack of spontaneous movement, marked hyperactivity, signs of pain, circling, lack of balance, loss of function. If an animal had mild symptoms, it was immediately scanned by MRI to confirm aneurysm rupture. If the MRI did not confirm the rupture, the animal was kept in observation if no sign of pain was observed (**Figure 1**). All asymptomatic animals were kept and followed until the end of the protocol (day 20). They were scanned by MRI to assess the amount of asymptomatic unruptured or ruptured aneurysms. The number of aneurysms was measured using 3D-T1-CE-W MRI scans. The hemorrhage volumes were measured on T2* MRI scans using ImageJ software (NIH Image, Bethesda, MD). The occurrence of ruptured an unruptured aneurysm, the number of aneurysms, the volume of hemorrhages were estimated with the data collected during and at the end of the follow-up protocol. Animals found dead during the protocol were excluded from the data analysis.

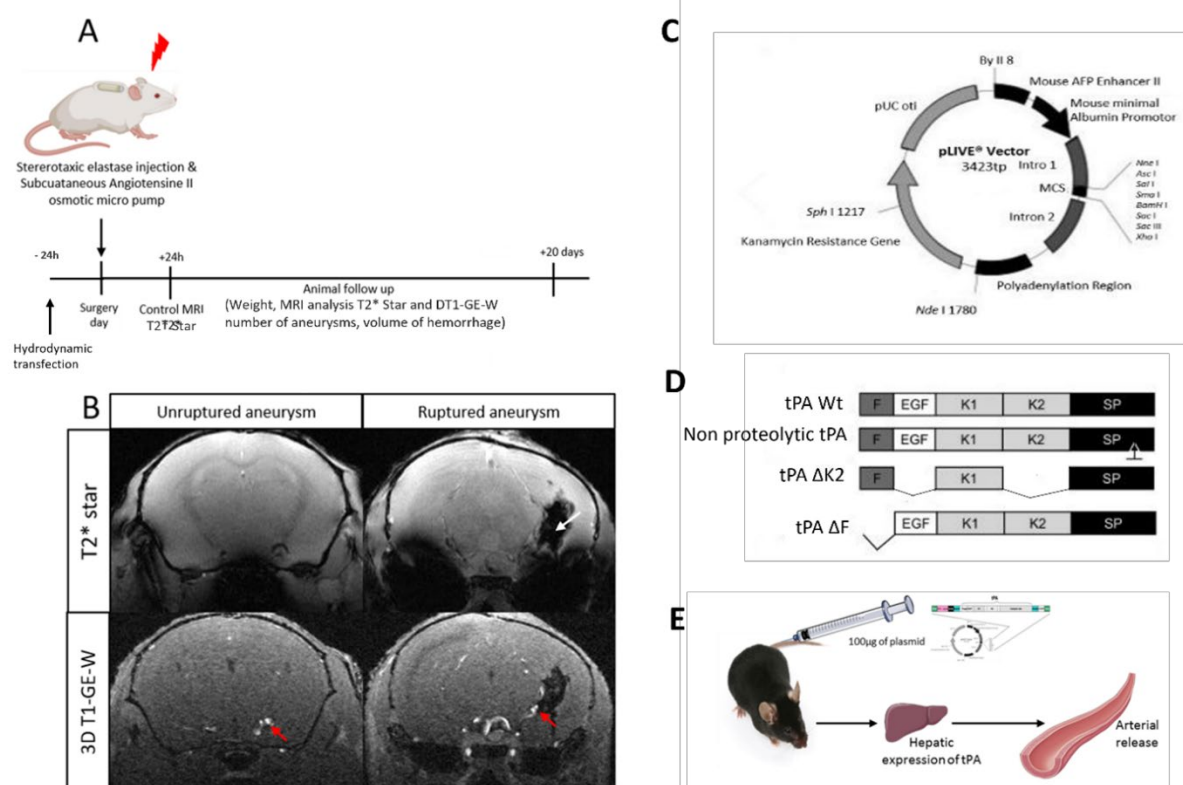


Figure 1: Experimental protocol. **A:** IA model was performed by stereotaxic injection of elastase in 8-week-old male mice combined with a subcutaneous infusion of angiotensin II over 14 days (Osmotic pump p1001, Alzet®). The animals were kept 20 days before euthanasia. On day 1, a T2* Star sequence was performed to exclude animals with bleeding due to unsuccessful surgery. **B:** T2* Star sequence was performed to confirm the rupture of IA with the presence of hyposignal due to hemorrhage (white arrow). A 3-dimensional T1 contrast-enhanced weighted (3DT1-GE-W) was performed to confirm the presence of an IA (red arrow). **C:** Plasmid constructions used for hydrodynamic transfections, a cDNA encoding for Wild type tPA was placed under the control of a hepatocyte-specific promoter in the P-Live plasmid. Parallel constructs were generated for each mutant studied. **C:** Schematic representation of the tPA mutants used (tPA Δ K2, tPA SC478A, tPA Δ F). **D:** Design of the procedure used for hydrodynamic transfections.

Immunohistochemistry

The brain was extracted immediately after the animal's death and snap frozen at -80°C on dry ice. All samples were sectioned to a thickness of 10 μ m in a cryostat and collected on poly-lysine slides. A mouse-on-mouse polymer kit (Abcam, ab269452) was used to allow the use of a mouse primary antibody for the endothelial Glun1 subunit of the NMDAR. Immunohistochemistry was performed by incubation with a blocking reagent, followed by overnight incubation at room temperature with the primary antibody solution (in incubation buffer): A mouse monoclonal Glunomab[®] (1:1000), rabbit anti-tPA monoclonal (1/3000, provided by HR Lijnen, University of Leuven, Belgium), goat anti-collagen IV (1/1000, Southern Biotech, Birmingham, USA). Next, detection was performed with the appropriate secondary antibodies (FITC, Cy3, or Cy5, 1/500, Jackson ImmunoResearch Suffolk, UK). Between each step, the slides were washed with phosphate buffer.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 9.0.0 (121) for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, <http://www.Graphpad.com>. The onset of aneurysm rupture was analyzed using Kaplan Meier graphics, a log-rank test, and the hazard ratio was calculated

using the Mantel and Haenszel methods. The number of aneurysms per animal was expressed as the mean $\pm$ standard deviation, analyzed by Welch's corrected ANOVA or Welch's t-test. The occurrence of ruptured and unruptured aneurysms was compared using χ^2 or Fisher's exact test (unilateral test). Finally, the hemorrhage volumes on the ruptured aneurysms were presented with the mean $\pm$ standard deviation and analyzed by Welch's t-test.

Results

Inactivation of endogenous tPA protects against IA formation and rupture

In the present study, tPA deficient mice (tPA-null) and their Wild type littermates (tPA Wt) were subjected to IA formation and rupture as previously reported by Labeyrie et al. (2017) in a different mouse strain. In contrast to a complete locus deletion, including deletion of additional genes than tPA itself in the formal tPA Knockout mice²³, the tPA-null mice used in the present study were generated by deletion of exon 3 in the tPA gene (PLAT)²⁴. Interestingly, tPA null mice and the tPA Wt had significantly different onset of aneurysm ruptures (log-rank test, $p = 0.0031$), with a hazard risk in the tPA-null mice of 0.10 (0.02–0.45), meaning that the deletion of tPA leads to a decrease in the aneurysmal rupture rate of 90% compared with the control Wild type animals (**Figure 2A**). The number of animals with aneurysms differed between both groups (chi-squared test: $\chi^2 = 3.91$, $df = 1$, $p = 0.024$). Indeed, 100% of the tPA-Wt developed at least 1 aneurysm and 82% had ruptured aneurysm(s), whereas only 67% of the tPA null mice developed at least one aneurysm, and only 25% had ruptured aneurysm(s) ($\chi^2 = 4.44$, $df = 1$, $p = 0.017$) (**Figure 2B**). The tPA-null mice had significantly fewer aneurysms, 1 aneurysm in average per animal compared with the tPA Wt with 2 aneurysms on average (paired t-test: $df = 21$, $p < 0.001$) (**Figure 2C**). The hemorrhage volumes after aneurysm rupture did not reveal a difference between groups; however, 9 animals out of 11 in the tPA Wt group and only 3 animals out of 12 had in the tPA null group had an aneurysmal rupture (**Figure 2D**).

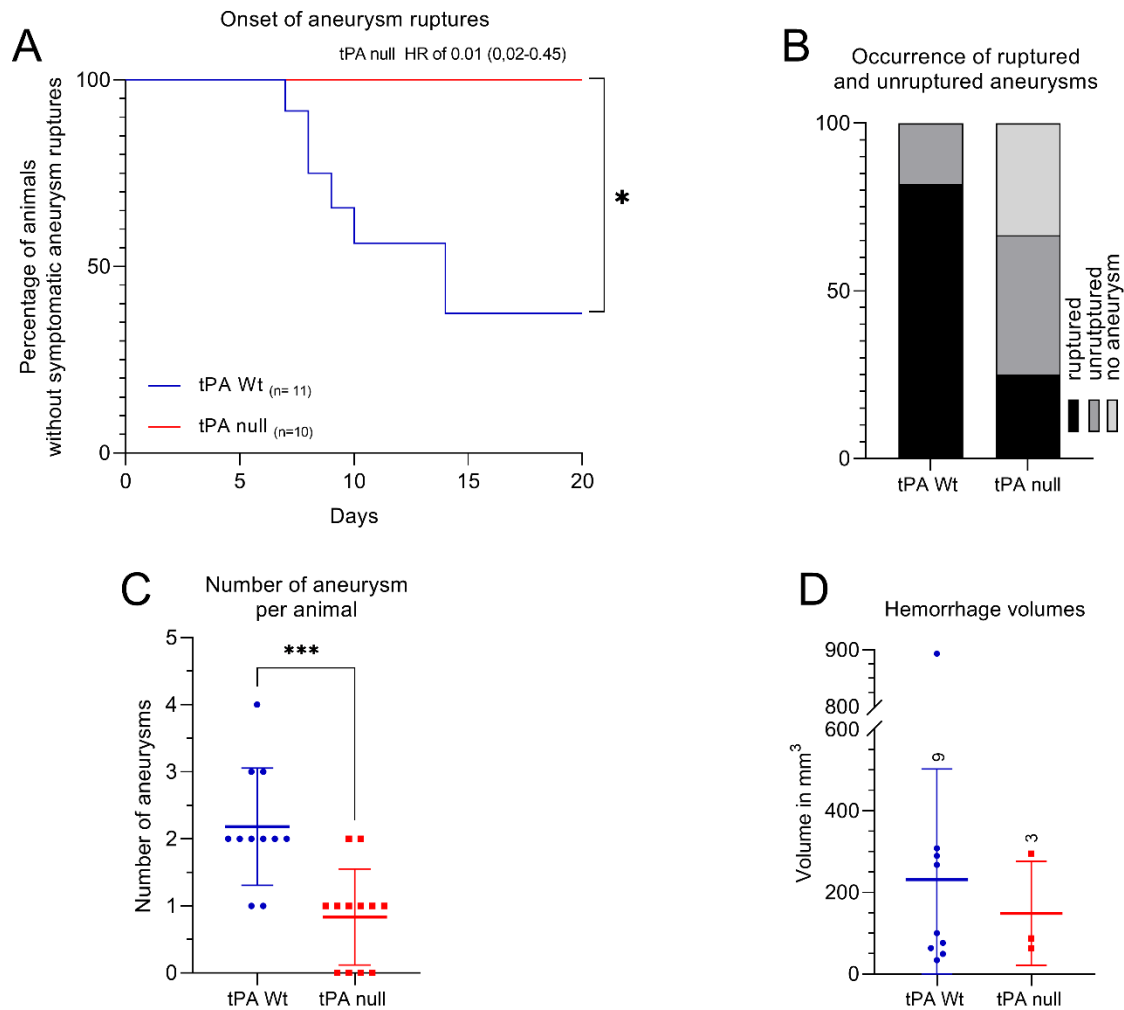


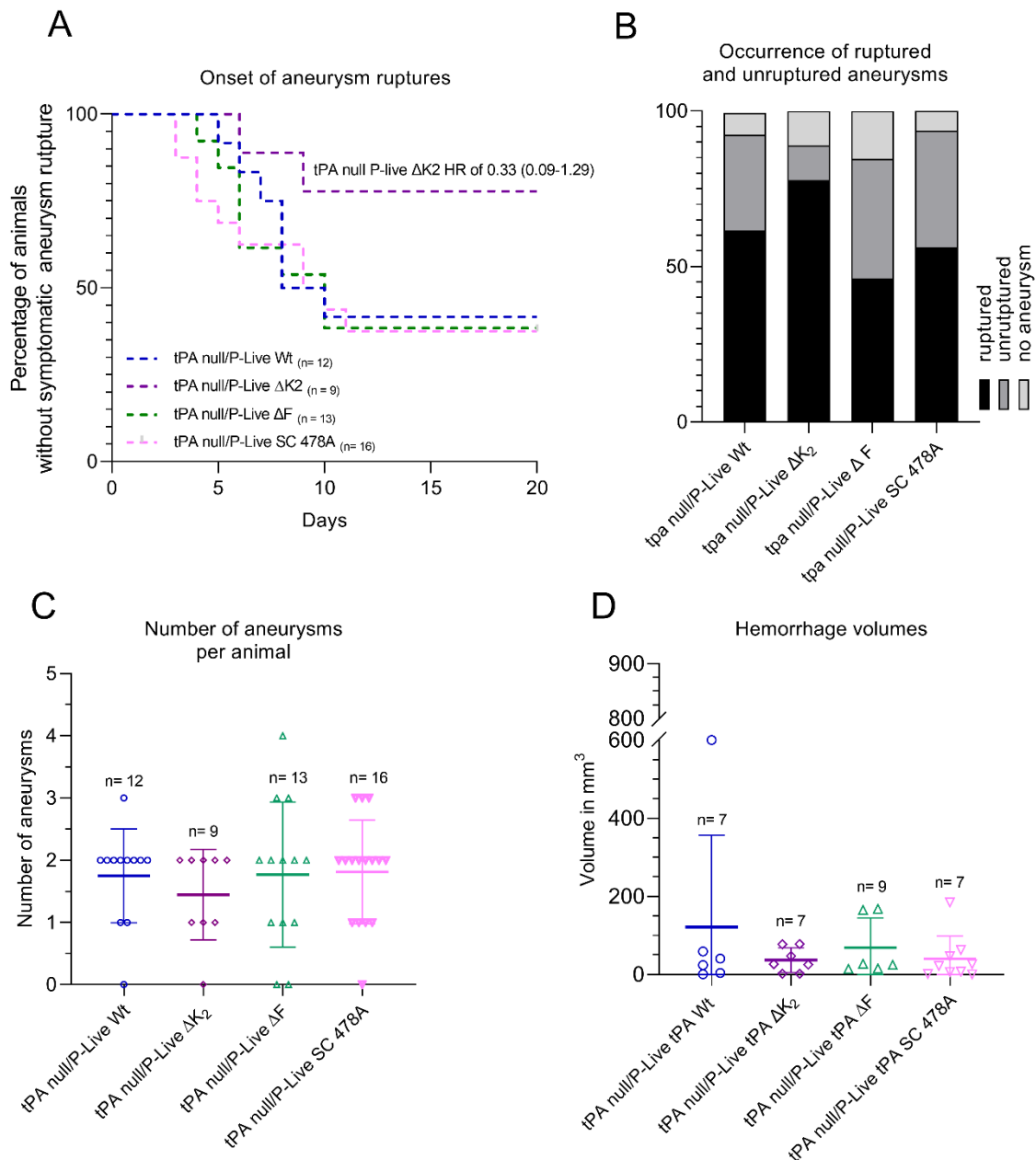
Figure 2: Inactivation of endogenous tPA protects against IA formation and rupture. IA were induced in tPA-null ($n = 12$) mice and their Wild type littermates (tPA-Wt, $n = 11$). **A:** The onset of aneurysm ruptures observed during animal follow-up was significantly different between tPA null mice and their Wt counterparts (log-rank test, $p = 0.003$). **B:** The occurrence of ruptured and unruptured aneurysms was significantly different between the two groups for the percentage of animals with aneurysms ($\chi^2 = 3.91$, $df = 1$, $p = 0.024$), as well as for the percentage of animals with ruptures ($\chi^2 = 4.44$, $df = 1$, $p = 0.017$). **C:** The number of aneurysms per animal observed on the T1 contrast-enhanced weighted MRI images (all animals included) differed significantly between the two groups (unpaired t-test $df = 21$, $p < 0.001$). **D:** The hemorrhage volumes were measured from the T2* scans in the animals with aneurysmal ruptures. No difference was found between the two groups.

Vascular tPA contributes to the formation of aneurysms and rupture

Figure 3: The absence of Kringle 2 domain delays the onset of aneurysm rupture. **A:** Kaplan Meyer graph of the onset of aneurysm rupture in the different experimental groups of tPA-null mice after hydrodynamic transfections of the various P-Live constructions. The different groups are tPA null/P-Live-tPA Wt $n = 12$, tPA null/P-Live-tPA ΔK_2 $n = 9$, tPA null/P-Live tPA ΔF $n = 13$ and tPA null/P-Live tPA SC478A $n = 16$. **B:** The occurrence of ruptured and unruptured aneurysms of each group **C:** Number of aneurysms per animal. **D:** The hemorrhage volumes on ruptured aneurysms were measured on a T2* scan.

Absence of the Kringle 2 domain delays the onset of aneurysm ruptures

For all tPA mutants (tPA ΔK_2 , tPA ΔF , and tPA SC 478A) expressed in tPA-null mice, only the tPA-null/P-Live tPA ΔK_2 ($n = 9$) presented a different onset of ruptures profile compared with the tPA-null/P-Live tPA Wt ($n = 12$), with a hazard risk in the tPA-null/P-Live tPA ΔK_2 of 0.33 (0.09-1.29) meaning that tPA-null/P-Live tPA ΔK_2 had a decrease of 67% in the ruptured aneurysm rate (**Figure 3A**). However, no statistical difference was found in the occurrence of ruptured and unruptured aneurysms, the number of aneurysms per animal, or the hemorrhage volumes between the four groups (**Figure 3B, C, and D**).



Presence of tPA and NMDA receptors (GluN1) in the wall of intracranial aneurysms

tPA was reported to modulate NMDA receptor (NMDAR) signaling²⁵, in neurons and in endothelial cells^{16,26}, thus promoting neuroinflammation²⁷, and the Kringle 2 domain was involved in this mechanism²⁸. Therefore, we postulated that a tPA-dependent NMDAR process could mediate the deleterious effects of circulating tPA in IA. We thus performed tPA and GluN1 subunit of NMDAR immunohistochemistries on unruptured aneurysms and their control arteries in tPA Wt mice ($n=3$).

The intensities of the tPA staining were higher in the aneurysm walls than in the healthy vessels (**Figure**

4). The GluN1 staining was visible in both the healthy vessels and on aneurysms.

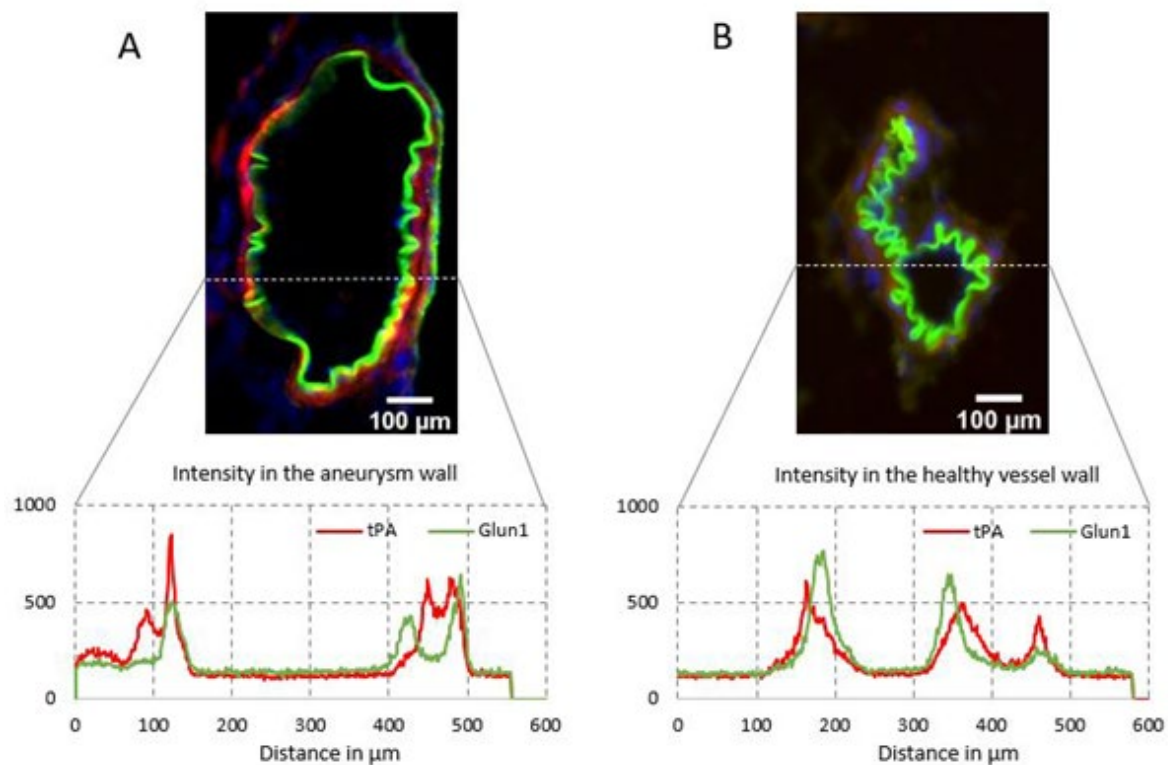


Figure 4: Presence of tPA and GluN1 in the aneurysm wall. Representative images ($n = 3$) of immunohistochemistry performed on animals with unruptured aneurysms and contralateral arteries (tPA in red, GluN1 in green, and 4',6-diamidino-2-phenylindole in blue). **A.** Representative image of an unruptured aneurysm. The presence of tPA and NMDAR (GluN1) is visible within the aneurysm walls. The GluN1 staining was visible in endothelial cells and the tPA staining in the intima of the aneurysm walls. **B.** Representative image of healthy contralateral vessels.

GluN1, a monoclonal antibody that prevents tPA-dependent NMDAR signaling and protects against IA formation and rupture

To better understand whether tPA-dependent NMDAR signaling was implicated in IA formation and rupture, we tested the impact of an intravenous injection of GluN1[®] in Wild type mice subjected to conditions producing IA. In addition, a control group of Wild type mice injected with an inactive control for GluN1 was analyzed (this control antibody binds

NMDAR but without blocking the tPA-dependent NMDAR signaling site²⁹). The two groups displayed a significantly different onset of aneurysm rupture (log-rank test, $p = 0.033$), with a 76% decrease of the aneurysm rupture rate in the Glunomab[®]-treated group (**Figure 5A**). The occurrence of ruptured and unruptured aneurysms showed that 100% of the animals in the control group developed an aneurysm. By comparison, 58% of the animals of the Glunomab[®] group had an aneurysm ($\chi^2 = 7.22$, $df = 2.69$, $p = 0.007$). Although no statistical differences were found in the percentage of the ruptured aneurysms point estimate of occurrence demonstrated, 86% of the animals treated with the control antibody had an aneurysm rupture compared with no more than 17% in the Glunomab[®]-treated group (**Figure 5B**). The two groups had a significantly different number of aneurysms per animal, with a mean of 1.8 aneurysms in the control group and only 0.75 in the Glunomab[®]-treated group (Welch's t-test: $df = 23$, $p = 0.003$) (**Figure 5C**). Only 3 animals out of 7 had ruptured aneurysms in the Glunomab[®]-treated group compared with 11 out of 14 for the control group (**Figure 5D**). The bleeding volumes were significantly smaller in the Glunomab[®]-treated animals than in control-treated animals (Welch's t-test $df = 10.41$, $p = 0.048$).

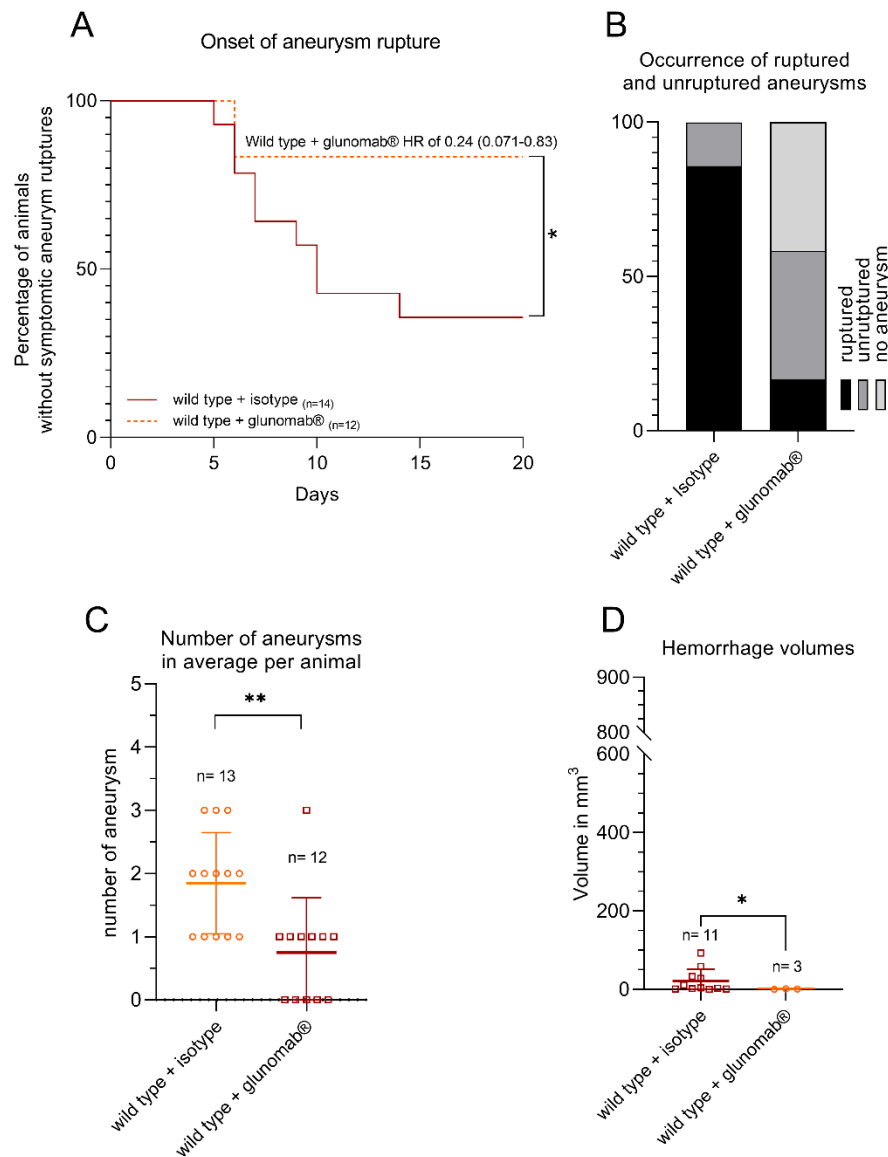


Figure 5: Glunomab® protects against IA formation and rupture. **A:** Onset of aneurysm rupture of the two groups was significantly different (log-rank test, $p = 0.033$) **B:** The occurrence of ruptured and unruptured aneurysms. Although no difference was found in the percentage of animals with ruptured aneurysms, a significant difference was found between the two groups for the percentage of animals with aneurysms ($\chi^2 = 5.86$, $df = 1$, $p = 0.015$). **C:** The number of aneurysms per animal was significantly different between the two groups (unpaired t-test; $df = 23$, $p = 0.003$). **D:** Hemorrhage volumes in ruptured aneurysms were significantly different between the two groups (Welch's t-test $df = 10.41$, $p = 0.048$).

Discussion

Our data reveal that the tPA present in the circulation is a putative pharmacological target to reduce IA formation and rupture. An increase in tPA expression was reported in the Abdominal Aortic Aneurysm walls compared with normal abdominal aortas³⁰. Moreover, the plasma concentration of tPA was positively correlated with abdominal aortic aneurysm growth^{31,32}. Accordingly, the expression of PAI-1 (principal tPA inhibitor in the circulation) was reported to be protective in this context³³. These data demonstrate that tPA-dependent pathways are implicated in the extracellular matrix remodeling mechanisms responsible for aneurysm growth in animal model systems. Indeed, the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm in humans is marked by the enzymatic degradation of the vessel's elastic lamina and of the extracellular matrix proteins surrounding the vessels. Besides its fibrinolytic activity, plasmin plays a critical role in tissue remodeling and could be implicated in aneurysm development^{31,33,34}.

tPA was studied in the physiopathology of IA. The results presented in our study agree with the previous work published by Labeyrie et al. (2017), thus confirming the implication of tPA in the formation of intracranial aneurysms and possibly in their rupture. Indeed, in two different strains of tPA-deficient mice (tPA KO mice²³ and tPA null mice²⁴), the absence of tPA led to a reduction of aneurysm incidence, an effect reversed with the presence of tPA in the bloodstream. Indeed, the hydrodynamic transfection of a vector encoding hepatocytic production of Wild type tPA in tPA null mice, with a subsequent release of tPA in the bloodstream, restored the Wild type phenotype in terms of susceptibility to IA. As previously reported, the hydrodynamic transfection used in the present study leads to a high expression of tPA or tPA mutants during the first 7 days after transfection, followed by a reduced

expression later on²¹. These data support the hypothesis of the vascular origin of the tPA implicated in the physiopathology of IA.

The ability of the tPA to activate plasminogen into plasmin is dependent on its proteolytic activity. Our results obtained with a non-proteolytic tPA did not directly imply the proteolytic activity of tPA in IA formation and rupture in this model. The finger domain of tPA is known to interact with low-density lipoprotein related protein (LRP) receptors³⁵. LRP is a receptor with roles in transendothelial transports through the blood brain barrier³⁶. In addition, LRP1 has been shown to play a critical role in protecting vasculature integrity and against aneurysm formation^{37,38}. Our data, using a tPA with its finger domain deleted, seems to exclude a role of LRPs in IA formation and rupture. However, our results show that the absence of the Kringle 2 domain of tPA directly impacts the onset of aneurysmal ruptures. The tPA was reported to bind the GluN1 subunit of NMDAR and then promote its signaling both in neurons and endothelial cells²⁵. Notably, the Kringle 2 domain of tPA is necessary to mediate this effect²⁸. Interestingly, NMDAR and LRP receptors were shown to co-operate to mediate some neuronal functions of tPA^{39–41}. Thus, the role of LRP is not entirely excluded by these experiments.

Immunohistochemistry performed in parallel experiments revealed an overexpression of tPA in the aneurysmal walls and a constitutive expression of NMDARs in endothelial cells (GluN1 immunostaining), suggesting a clear potential for interaction between the two proteins. Furthermore, in endothelial cells, NMDARs were reported to be functional, with involvement in the control of monocyte migration²⁶ and control of the integrity of the blood-brain barrier⁴². Accordingly, Glunomab[®], a monoclonal antibody, was designed and characterized to inhibit the binding of tPA on the GluN1 subunit of NMDARs and subsequent signaling²⁹, including inflammatory process signaling in a model of autoimmune encephalomyelitis⁴³.

Our results show that Glunomab® injected intravenously after IA induction was protective against the formation of intracranial aneurysms and rupture. Aneurysm formation and rupture are due to mechanisms involving relationships between inflammation, remodeling of the extracellular matrix, and blood flow modifications^{7,8,44}. Extracellular matrix remodeling is a process underlying the initial step of aneurysm formation and growth. The metalloproteases are significant components of this remodeling. They can be activated by inflammatory cells and by tPA itself^{14,15}. The blood flow and the associated shear stresses would likely be the initial triggers for aneurysm formation and one of the triggers for their rupture^{3,11}. Interestingly, recent data also suggest that NMDAR in endothelial cells could be implicated in cerebral blood-flow regulation^{45,46}, and vascular tPA could be capable of mediating these processes^{47,48}.

Altogether, the present study gives new insights into the pathophysiology of IA by demonstrating that tPA-dependent endothelial NMDAR signaling could be involved. Also interesting, our present data propose that a monoclonal antibody targeting this process, Glunomab®, injected intravenously could be a useful therapeutic for this devastating disease.

Acknowledgments

We express our gratitude to all the CURB staff and all participants who took part in the studies. This work was supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research and the Caen Normandie University. This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 813294 (ENTRAIN).

Author contributions

EL, CO, JP, and DV contributed to the conception and design of the study; EL, CO, and DV contributed to the acquisition and analysis of data; EL, OC, JP, DH, and DV contributed to drafting the text and figures.

Potential conflict of interest

Op2Lysis has no financial interest in the research described in this paper. D. Vivien is co-author of the patent for Glunomab “NOVEL ANTIBODY USEFUL IN NEUROLOGICAL OR NEURODEGENERATIVE DISORDERS, Publication number: 20180371082

References

1. Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, et al. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2011; 10: 626–636.
2. Chemmanam T, Davis S. Intracerebral hemorrhage. In: Carhuapoma JR, Mayer SA, Hanley DF (eds) *Stroke*. Cambridge University Press, pp. 174–195.
3. Frösen J, Cebal J, Robertson AM, et al. Flow-induced, inflammation-mediated arterial wall remodeling in the formation and progression of intracranial aneurysms. *Neurosurg Focus* 2019; 47: E21.
4. Frösen J, Piippo A, Paetau A, et al. Remodeling of Saccular Cerebral Artery Aneurysm Wall Is Associated With Rupture. *Stroke* 2004; 35: 2287–2293.
5. Chyatte D, Bruno G, Desai S, et al. Inflammation and Intracranial Aneurysms. *Neurosurgery* 1999; 45: 1137–1147.
6. Gaetani PG, y Baena RR, Tartara F, et al. Metalloproteases and intracranial vascular lesions. *Neurol Res* 1999; 21: 385–390.
7. DePaola N, Gimbrone MA, Davies PF, et al. Vascular endothelium responds to fluid shear stress gradients. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1254–1257.
8. Hashimoto T, Meng H, Young WL. Intracranial aneurysms: links among inflammation, hemodynamics and vascular remodeling. *Neurol Res* 2006; 28: 372–380.
9. Etminan N, Buchholz BA, Dreier R, et al. Cerebral aneurysms: Formation, progression and developmental chronology Nima. *Transl Stroke Res* 2015; 5: 167–173.
10. McGloughlin TM. *Biomechanics and Mechanobiology of Aneurysms*. Epub ahead of

print 2011. DOI: 10.1007/978-3-642-18095-8.

11. Cebal J, Ollikainen E, Chung BJ, et al. Flow Conditions in the Intracranial Aneurysm Lumen Are Associated with Inflammation and Degenerative Changes of the Aneurysm Wall. *Am J Neuroradiol* 2017; 38: 119–126.
12. Labeyrie P-E, Goulay R, Martinez de Lizarrondo S, et al. Vascular Tissue-Type Plasminogen Activator Promotes Intracranial Aneurysm Formation. *Stroke* 2017; 48: 2574–2582.
13. Lijnen HR, Collen D. Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Baillieres Clin Haematol* 1995; 8: 277–290.
14. Lo EH, Wang X, Louise Cuzner M. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: Role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res* 2002; 69: 1–9.
15. Heissig B, Salama Y, Takahashi S, et al. The multifaceted role of plasminogen in inflammation. *Cell Signal* 2020; 75: 109761.
16. Mehra A, Guérit S, Macrez R, et al. Nonionotropic action of endothelial NMDA receptors on blood–brain barrier permeability via Rho/ROCK-mediated phosphorylation of myosin. *J Neurosci* 2020; 40: 1778–1787.
17. Macrez R, Ortega MC, Bardou I, et al. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2016; 139: 2406–2419.
18. Marx I, Christophe OD, Lenting PJ, et al. Altered thrombus formation in von Willebrand factor deficient mice expressing von Willebrand factor variants with defective binding to collagen or GPIIbIIIa. *Blood* 2008; 112: 603–609.

19. Parcq J, Bertrand T, Baron AF, et al. Molecular requirements for safer generation of thrombolytics by bioengineering the tissue-type plasminogen activator A chain. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 539–546.
20. Cassé F, Bardou I, Danglot L, et al. Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J Neurosci* 2012; 32: 5186–5199.
21. Marcos-Contreras OA, Martinez de Lizarrondo S, Bardou I, et al. Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism. *Blood* 2016; 128: 2423–2434.
22. Labeyrie P-E, Goulay R, Martinez De Lizarrondo S, et al. Vascular Tissue-Type Plasminogen Activator Promotes Intracranial Aneurysm Formation. *Stroke*; 48. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.017305.
23. Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994; 368: 419–424.
24. Pasquet N, Douceau S, Naveau M, et al. Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cereb Cortex* 2019; 29: 2482–2498.
25. Nicole O, Docagne F, Ali C, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001; 7: 59–64.
26. Reijerkerk A, Kooij G, Van Der Pol SMA, et al. The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. *J Neurochem* 2010; 113: 447–453.
27. Mehra A, Ali C, Parcq J, et al. The plasminogen activation system in neuroinflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2016; 1862: 395–402.

28. Lopez-Atalaya JP, Roussel BD, Levrat D, et al. Toward safer thrombolytic agents in stroke: Molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 1212–1221.
29. Lesept F, Chevilly A, Jezequel J, et al. Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death Dis* 2016; 7: e2466–e2466.
30. Reilly JM, Sicard GA, Lucore CL. Abnormal expression of plasminogen activators in aortic aneurysmal and occlusive disease. *J Vasc Surg* 1994; 19: 865–872.
31. Lindholt JS, Jørgensen B, Shi GP, et al. Relationships between activators and inhibitors of plasminogen, and the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003; 25: 546–551.
32. Lindholt JS. Activators of plasminogen and the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1085: 139–50.
33. Oszejca K, Wroński K, Janiszewska G, et al. The study of t-PA, u-PA and PAI-1 genes polymorphisms in patients with abdominal aortic aneurysm. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 2859–2864.
34. Jean-Claude J, Newman KM, Li H, et al. Possible key role for plasmin in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Surgery* 1994; 116: 472–478.
35. Bu G, Williams S, Strickland DK, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 7427–7431.
36. Asahi M, Wang X, Mori T, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral

- ischemia. *J Neurosci* 2001; 21: 7724–7732.
37. Boucher P. LRP: Role in Vascular Wall Integrity and Protection from Atherosclerosis. *Science (80-)* 2003; 300: 329–332.
38. Muratoglu SC, Belgrave S, Hampton B, et al. LRP1 protects the vasculature by regulating levels of connective tissue growth factor and HtrA1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 2137–2146.
39. Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, et al. The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 β -chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 2008; 283: 12004–12013.
40. Samson AL, Nevin ST, Croucher D, et al. Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J Neurochem* 2008; 107: 1091–1101.
41. Bacskai BJ, Xia MQ, Strickland DK, et al. The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11551–11556.
42. Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SMA, et al. Tissue-Type Plasminogen Activator Is a Regulator of Monocyte Diapedesis through the Brain Endothelial Barrier. *J Immunol* 2008; 181: 3567–3574.
43. Macrez R, Obiang P, Gauberti M, et al. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 2011; 42: 2315–2322.
44. Chiu J-J, Chen C-N, Lee P-L, et al. Analysis of the effect of disturbed flow on monocytic adhesion to endothelial cells. *J Biomech* 2003; 36: 1883–1895.

45. Lemaistre JL, Sanders SA, Stobart MJ, et al. Coactivation of NMDA receptors by glutamate and D-serine induces dilation of isolated middle cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 537–547.
46. Hogan-Cann AD, Lu P, Anderson CM. Endothelial NMDA receptors mediate activitydependent brain hemodynamic responses in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116: 10229–10231.
47. Anfray A, Drieu A, Hingot V, et al. Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors. *J Cereb Blood Flow Metab* 2020; 40: 2038–2054.
48. Park L, Zhou J, Koizumi K, et al. TPA deficiency underlies neurovascular coupling dysfunction by amyloid-b. *J Neurosci* 2020; 40: 8160–8173.

Discussion

15 Discussion et conclusions : développement d'un nouveau produit pour le traitement des accidents vasculaires hémorragiques au sein d'Op2Lysis

L'ensemble des travaux présentés dans l'article *O2L-001, a sustain release formulation of an optimized tPA for an efficient and safe thrombolysis* permet de démontrer l'efficacité d'un mutant du tPA optimisé dans une formulation retard. Il regroupe d'une part des expériences conduites par des prestataires extérieurs et d'autre part des expériences conduites en interne chez Op2Lysis. Ces dernières sont le fruit d'un travail d'équipe regroupant plusieurs compétences complémentaires. Je vais donc développer uniquement les expériences que j'ai conduites personnellement, pour répondre à mes objectifs de thèse. En abordant, si la discussion le demande, d'autres résultats présentés dans cet article.

Pour répondre à mes objectifs que j'ai abordés précédemment dans le **chapitre 11.1**, j'ai développé principalement deux modèles de thrombolyse *ex vivo* présentés dans l'article 1 présenté en **chapitre 12**. Je les développe ici dans l'ordre dans lequel je les ai conçus.

Dans un premier temps, pour identifier les différents paramètres influençant la lyse ainsi que les conditions nécessaires pour obtenir une lyse optimale, j'ai développé un premier modèle de thrombolyse *ex vivo*. Ce dernier permet d'observer la thrombolyse au cours du temps sur des caillots de petit volume (1ml) immergés dans des solutions contenant ou non un thrombolytique. Le choix de la méthode d'administration du thrombolytique a été inspiré d'un modèle *in vivo* déjà décrit dans la solution de thrombolytique et le caillotrature (Bonnard et al. 2017). La différence du volume de 10X entre le caillot et de la solution permet un apport constant de nouveaux réactifs et de mimer un relargage continu. Grâce à ce modèle, j'ai montré que l'efficacité de la thrombolyse dépendait du temps d'exposition du caillot à un thrombolytique et de la concentration de ce dernier. En effet, une concentration plus faible associée à un temps d'exposition plus long permet d'obtenir une thrombolyse plus efficace, en comparaison à une forte concentration associée à une courte durée d'exposition (*O2L-001, a sustain release formulation of an optimized tPA for an efficient and safe thrombolysis*), et

cela, même si cette dernière est répétée. Ce modèle m'a également permis de mettre en évidence que la fenêtre de traitement optimal était située entre 5h et 7h après l'administration. J'ai également pu identifier une concentration seuil inférieur ($0.1\mu\text{g/ml}$) en dessous de laquelle aucun effet thrombolytique n'est observé et une concentration seuil supérieur de $1\mu\text{g/ml}$ au-delà de laquelle aucune augmentation de la thrombolyse à 24h n'est observable dans ce modèle. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus sur un autre modèle de thrombolyse, précédemment publiés (Bonnard et al. 2017). Bien que nous n'ayons pas testé la cinétique de la protéine, la diminution de l'effet thrombolytique observée au-delà de la concentration de $1\mu\text{g/ml}$ peut s'expliquer par les limites de liaisons du tPA à la fibrine et la vitesse de dissociation entre le tPA et la fibrine (Husain, Hasan, and Budzynski 1989; Piebalgs et al. 2018)

Les connaissances de la demi-vie du tPA dans la circulation (Fuchs, Berger, and Pizzo 1985; Verstraete et al. 1985), ont conduit à investiguer une fenêtre de traitement d'1h dans les modèles *ex vivo*, (Keric et al. 2017) et dans les essais cliniques (Hanley et al. 2016, 2019). Les résultats montrent de manière intéressante que l'augmentation du temps d'exposition du caillot au-delà d'1h augmente la thrombolyse.

Les résultats obtenus avec ce modèle sont donc la preuve de concept pour le développement d'un thrombolytique avec une formulation à relargage continu.

Cependant, le mode d'administration utilisé dans ce modèle n'est pas représentatif du mode d'administration voulu pour notre produit, soit une injection au cœur de l'hématome. De plus, la taille des caillots de 1ml est très lointaine de la situation clinique avec des caillots compris entre 30 et 45ml (Hanley et al. 2019).

Dans un deuxième temps, afin de tester la formulation à relargage continu de notre produit, j'ai développé un second modèle de thrombolyse *ex vivo*, sur des caillots de 5ml avec une injection de produit au centre du caillot. Cette méthode permet de se rapprocher du mode d'administration cible. Pour inclure les résultats obtenus avec le premier modèle développé, j'ai utilisé une fenêtre d'observation thérapeutique de 9h après l'initiation du traitement. Pour tester l'efficacité de notre formulation retard, j'ai comparé l'injection de notre produit avec un protocole d'injections répétées toutes les 4h (3 injections). Les résultats obtenus avec ce modèle m'ont permis de montrer l'efficacité de la formulation à relargage continu d'un thrombolytique ainsi que la supériorité de notre produit. Effectivement, nos résultats ont

montré que l'O2L-001 est plus efficace à la même concentration que le rtPA. Une efficacité supérieure que l'on retrouve avec une concentration 3 fois plus faible. On obtient également une efficacité équivalente avec une concentration 10 fois plus faible d'O2L-001. Néanmoins, la taille des caillots dans ce modèle étant entre 6 et 9 fois plus petite que les hématomes retrouvés en clinique (Hanley et al. 2019). Il serait intéressant de reproduire ces résultats dans un modèle avec des caillots ayant un volume plus proche que de ceux observés en clinique. Le modèle de 5ml ne prend pas en compte la méthode d'injection et de drainage similaire aux protocoles utilisés dans les essais cliniques.

Pour remédier à ces limitations, je travaille actuellement sur un modèle d'hématome de plus grande taille (25ml), déjà décrit dans la littérature (Keric et al. 2017). L'augmentation de la taille du caillot permet l'utilisation de cathéters de drainage ventriculaire externe similaires à ceux utilisés lors des essais cliniques. L'adaptation de ce modèle à notre problématique soit l'augmentation de la fenêtre de traitement permet de tester l'efficacité de notre produit dans des conditions proches de celles rencontrées en clinique.

Les analyses faites en externe sur la dissolution de notre produit utilisant une méthode HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) montrent un relargage d'OptPA sur 6h avec une phase de plateau sur les heures suivantes. Ce temps de relargage correspond au temps nécessaire pour une lyse optimale située entre 5 et 9h. Considérant les résultats obtenus sur l'activité thrombolytique du rtPA et OptPA, les deux substances montrent une activité thrombolytique similaire. La formulation de l'OptPA avec un relargage continu permet donc d'obtenir une lyse plus efficace avec l'O2L-001. De surcroît, l'OptPA montre une plus faible capacité d'activation du plasminogène en plasmine. La plasmine étant un acteur majeur du remodelage tissulaire, en activant les MMP (Eeckhout and Vaes 1977; He et al. 1989; H.R. Lijnen et al. 1998), ces dernières étant impliquées dans les risques de transformation hémorragique (Montaner et al. 2001). Il est possible que la diminution de l'activation de la plasmine diminue donc les risques de resaignement. Ces éléments démontrent les avantages de l'O2L-001 pour une évacuation plus sûre et plus efficace des hématomes intracérébraux.

Les modèles développés ont permis de répondre à mes problématiques de thèse et d'obtenir des résultats et preuves de concept importants pour le développement de L'O2L-001. Cependant, comme tous modèles expérimentaux, il possède certaines limitations. Dans ces travaux, j'ai choisi d'induire la coagulation par l'utilisation de facteur tissulaire. Il s'agit d'un

acteur physiologique de la voie de coagulation extrinsèque présent en grande quantité dans le tissu cérébral (Drake, Morrissey, and Edgington 1989; Lockwood et al. 2009; Luther et al. 1996). L'initiation de la coagulation se ferait donc par l'activation du facteur tissulaire lors des hémorragies cérébrales (Chemmanam and Davis 2009). Néanmoins, les hémorragies cérébrales spontanées étant la conséquence de plusieurs pathologies sous-jacentes, il est possible que l'initiation de la coagulation se fasse par l'activation de plusieurs facteurs impliqués dans les voies extrinsèques et intrinsèques de la coagulation. Outre les coagulopathies, il a également été montré que certaines autres pathologies peuvent influencer la coagulation et la composition des caillots (Ariëns et al. 2002; Collet et al. 2006). De plus, il a été observé que la composition des caillots et l'âge de ces derniers influencent fortement les capacités thrombolytiques du rtPA (J W Weisel and Litvinov 2008; John W. Weisel 2007). J'ai donc pris en compte ce facteur en travaillant sur des caillots âgés de plus de 16h. Comme décrit dans l'article (*O2L-001, a sustain release formulation of an optimized tPA for an efficient and safe thrombolysis*). Cependant, j'ai remarqué au cours du développement de mes modèles que malgré cela certains caillots étaient de plus petites tailles et montraient des pourcentages de lyse plus faible. En effet, utilisant du sang humain en provenance de l'établissement du sang, chaque échantillon possède des caractéristiques propres aux donneurs pouvant influencer fortement la coagulation et la composition du caillot. Il serait donc intéressant pour mes modèles de faire des tests complémentaires sur ces échantillons pour mesurer les facteurs pouvant influencer la composition des caillots. Tel que : un dosage de fibrinogène, de thrombine, de LDL ou encore de la vitamine K.

Mes travaux de thèse sur le développement de l'O2L-001 ont permis de mieux comprendre les paramètres influençant la lyse, en démontrant l'importance du temps de traitement, de l'identification des concentrations seuils et ainsi d'identifier les conditions optimales pour l'administration de notre produit. Ils ont également permis de fournir les preuves de concept pour l'utilisation d'une formulation avec un relargage continu et de l'efficacité de notre produit.

16 Discussion et conclusions : l'impact du tPA dans l'anévrisme intracrânien

Mes travaux de thèse de recherche translationnelle portent sur l'implication du tPA dans l'anévrisme intracrânien. Mon premier objectif était de confirmer les résultats précédemment publiés par Labeyrie et al. 2017 en réaffirmant l'implication du tPA vasculaire dans la formation et possiblement la rupture des anévrismes intracrâniens. Pour démontrer l'implication du tPA vasculaire j'ai, dans un premier temps, utilisé un modèle d'anévrisme intracrânien *in vivo* sur des souris tPA null et leur wild type. Puis dans un deuxième temps, j'ai utilisé le même modèle *in vivo* sur des souris tPA null combiné à la transfection hydrodynamique d'un vecteur hépatocytaire codant pour un tPA wild type.

Comme attendu, mes résultats sont en accord avec Labeyrie et al. et confirment l'implication du tPA dans la formation des anévrismes intracrâniens et leur possible rupture. L'absence de tPA conduit à la réduction de l'incidence des anévrismes, un effet protecteur qui est inversé lorsque le tPA est à nouveau présent dans la circulation. Effectivement, la transfection hydrodynamique d'un vecteur codant pour la production hépatocytaire du tPA permet la sécrétion de ce dernier uniquement dans la circulation et ainsi de retrouver le phénotype des souris tPA Wild type. Le tPA vasculaire est donc nécessaire à la formation des anévrismes intracrâniens dans ce modèle.

Suite à ces résultats, mon deuxième objectif était de mieux comprendre par quels mécanismes le tPA était impliqué dans cette physiopathologie. Pour cela, comme expliqué dans mon projet de thèse, j'ai utilisé la même méthode d'induction des anévrismes *in vivo* combinée à la transfection hydrodynamique avec, dans ce cas, l'utilisation de mutants du tPA délétés d'un domaine ou d'une fonction pouvant être impliquée dans cette pathologie. Le premier mutant, le tPA S478A est comme décrit en introduction de l'article (*tPA-NMDAR signaling blockade reduces the incidence of intracerebral aneurysms*) est un tPA non protéolytique. L'activité protéolytique du tPA est indispensable pour l'activation du plasminogène en plasmine, cette dernière est impliquée dans plusieurs processus de remodelage tissulaire (HE et al. 1989; H. R. Lijnen 2001). La capacité du tPA à activer le plasminogène en plasmine a longtemps été pensée comme la voie d'action privilégiée de celui-ci dans la physiopathologie de l'anévrisme et notamment dans les anévrismes aortiques (Jean-Claude et al. 1994; Lindholt 2006; Oszajca et al. 2014). Mes résultats dans ce modèle ne permettent pas d'attester l'implication de

l'activité protéolytique du tPA et donc la voie d'action tPA-plasmine. Cependant, ce modèle ne prend pas en compte directement l'activité de la plasmine.

Le deuxième mutant testé, le tPA ΔF , est un tPA délété de son domaine finger. Le domaine finger du tPA est connu pour son interaction avec le récepteur LRP (Bu et al. 1992). Ce dernier fait partie de la famille des *Low Density Lipoprotein Related Protein*. Les récepteurs LRP sont des récepteurs impliqués dans diverses voies de signalisation, et notamment dans le transport à travers la barrière hématoencéphalique (Asahi et al. 2001). Ils ont également été décrits comme jouant un rôle important dans la protection de l'intégrité de la vasculature et contre la formation des anévrismes (Boucher 2003; Muratoglu et al. 2013). Mes résultats semblent exclure une interaction directe entre le tPA et le récepteur LRP dans cette pathologie.

Mes résultats ont permis de mettre en avant l'implication du domaine kringle 2 du tPA dans cette pathologie. Effectivement, seuls les animaux transfectés avec un tPA $\Delta K2$ (délété du domaine kringle 2) ont révélé un taux plus faible de déclaration de rupture (*onset of aneurysm ruptures*) (**figure 3, tPA-NMDAR signaling blockade reduces the incidence of intracerebral aneurysms**). Cependant ces animaux ne montrent pas de différences significatives en comparaison aux animaux tPA null transfectés avec du tPA Wild type sur les autres paramètres observés. Il est possible que ce manque de différence soit dû à l'expression transitoire du tPA lors de la transfection. En effet, il a été montré que la surexpression du tPA après la transfection hydrodynamique reste élevée durant 7 jours puis diminue progressivement (Marcos-Contreras et al. 2016).

Le domaine kringle 2 du tPA est indispensable à la liaison du tPA au récepteur NMDA (Lopez-Atalaya et al. 2008). Le tPA va se lier à la sous unité GluN1 du récepteur NMDA dans les neurones (Fernández-Monreal et al. 2004; Nicole et al. 2001) ou dans les cellules endothéliales du système nerveux central (Mehra et al. 2020; Reijerkerk et al. 2010). Une interaction qui augmenterait le passage de cellules inflammatoires à travers la barrière hématoencéphalique (Mehra et al. 2020; Reijerkerk et al. 2008). C'est pourquoi j'ai donc testé l'implication de l'axe tPA-NMDAR dans mon modèle. Pour cela, j'ai utilisé un anticorps monoclonal inhibant l'activation du récepteur NMDA à la liaison du tPA, le Glunomab[®] et son isotype. Les souris traitées avec le Glunomab[®] ont montré une forte diminution de la déclaration de rupture et de l'incidence des anévrismes. 58 % des animaux traités avec le Glunomab[®] ont développé un anévrisme contre 100% des animaux traités avec l'isotype. Et seulement 17% des animaux traités avec le Glunomab[®] ont eu une rupture d'anévrisme. De manière également très

intéressante, le volume des saignements après rupture était visiblement plus faible chez les animaux traités avec le Glunomab®. (malheureusement, la taille de l'échantillon et la distribution n'ont pas permis de montrer une significativité).

Ces résultats montrent donc que l'activation du récepteur NMDA par le tPA est impliquée dans cette maladie.

Comme expliqué dans le [chapitre 8.2 Mécanismes de formation des anévrismes intracrâniens](#), l'impact des contraintes de cisaillement sur la paroi va modifier l'expression génétique des cellules endothéliales, ces dernières vont devenir pro-inflammatoires. Ce phénomène déclenche le recrutement de cellules inflammatoires et est un élément clé dans beaucoup de pathologies vasculaires (Hashimoto, Meng, and Young 2006). Les cellules musculaires lisses des vaisseaux, vont également subir la même modification de phénotype. À la suite de ces phénomènes inflammatoires, le remodelage de la matrice extracellulaire déformera la lumière du vaisseau et l'anévrisme va croître. La rupture d'un anévrisme se produit lorsque la tension à la paroi est plus grande que la résistance de cette dernière (Figure 8). La résistance de la paroi est probablement déterminée par l'orientation des fibres de collagènes. Si ces dernières sont dans le sens du flux sanguin et des tensions induites à la paroi, cela lui procure une résistance plus grande. Elle dépend donc de la capacité de remodelage de la matrice extracellulaire (Cebal et al. 2016; Frösen et al. 2012).

La régulation du flux sanguin, l'inflammation et le remodelage tissulaire sont donc des mécanismes cruciaux dans la physiopathologie des anévrismes intracérébraux. De manière intéressante, le tPA est impliqué dans ces trois mécanismes. Dans le passage de cellules inflammatoires à travers les cellules endothéliales du SNC (Reijerkerk et al. 2008), mécanismes, qui comme cité plus haut impliqueraient une interaction avec le NMDAR (Mehra et al. 2020; Reijerkerk et al. 2010). Le tPA a également été décrit dans le remodelage tissulaire par, l'activation des protéinases MMP (Lo, Wang, and Louise Cuzner 2002; Montaner et al. 2001). Et plus récemment dans la régulation du flux sanguin dans le couplage neurovasculaire (Anfray et al. 2020; L. Park et al. 2020). Un phénomène qui impliquerait également le récepteur NMDA endothéliale (Hogan-Cann, Lu, and Anderson 2019; Lemaistre et al. 2012).

Le modèle d'induction des anévrismes utilisé dans ce projet de thèse ainsi que les paramètres observés pour estimer la sévérité de la pathologie ont permis d'identifier une voie de signalisation dans cette pathologie. Cependant, la méthode utilisée pour observer la rupture

repose sur le suivi quotidien du poids de l'animal ainsi que l'évaluation de ses symptômes et de son état neurologique. Donc la détection de cette dernière se fait uniquement après sa survenue et de manière indirecte en mesurant l'impact de la rupture et du saignement en découlant. Afin de mieux comprendre comment le tPA impacte la dynamique entre la formation et la rupture, il serait donc intéressant de compléter les données acquises avec ce modèle *in vivo* par des données provenant de modèles *in vitro*. L'utilisation d'un modèle *in vitro* permettrait également d'apporter des informations importantes quant aux voies de signalisation impliquées dans l'interaction tPA-NMDAR dans cette pathologie.

Conclusions

L'ensemble de mes travaux au sein d'Op2Lysis repose sur la mise en place de nouveaux modèles *in vitro* pour le développement de l'O2L-001. Mon premier objectif était de mettre en place un modèle de thrombolyse sur du sang humain permettant de déterminer les paramètres influençant la lyse ainsi que les conditions optimales de dosage de rtPA en termes de concentration minimale et de temps d'exposition. Mon second objectif était de développer un second modèle plus complexe permettant de tester et valider l'efficacité de la formulation retard d'un thrombolytique et celle de notre produit formulé dans les conditions optimales précédemment définies. Les deux modèles présentés dans cette thèse ont permis de répondre à ces problématiques. En effet, le premier modèle développé sur des caillots immergés de 1ml a permis d'identifier des concentrations seuils ainsi que l'importance du temps de traitement pour l'obtention d'une thrombolyse optimale. Le second modèle a permis de tester l'efficacité d'une formulation à relargage continu en intégrant la fenêtre de traitement optimal identifiée avec le premier modèle. Mes travaux ont donc permis de fournir les preuves de concept pour l'utilisation d'une formulation avec un relargage continu et de l'efficacité de notre produit. L'ensemble de mes travaux au sein d'Op2Lysis ont permis de répondre à mes problématiques de thèse.

L'objectif de mes travaux de thèse portant sur l'implication du tPA dans la physiopathologie était dans un premier temps de confirmer l'implication du tPA dans cette pathologie puis dans un deuxième temps d'identifier quel domaine du tPA était responsable de cette implication. Les résultats que j'ai obtenus ont permis de confirmer l'implication du tPA dans la formation des anévrismes intracrâniens et leur rupture. En effet, mes résultats montrent que l'absence du tPA conduit à la réduction de l'incidence des anévrismes. Un effet protecteur qui est inversé lorsque le tPA est à nouveau présent dans la circulation. Le tPA vasculaire est donc nécessaire à la formation des anévrismes intracrâniens dans ce modèle. Cela répond à mon premier objectif. Dans un second temps, l'étude des voies d'action du tPA dans cette pathologie a permis de mettre en évidence l'implication du domaine Kringle 2 du tPA. Effectivement, seuls les animaux transfectés avec un mutant délété du domaine Kringle 2 du tPA ont montré un taux plus faible de déclaration de rupture (*onset of aneurysm ruptures*). Une implication confirmée par l'utilisation d'un anticorps inhibant l'activation du récepteur

NMDA par le tPA, le Glunomab[®]. Les animaux traités avec le Glunomab[®] ont montré une forte diminution de la déclaration de rupture et de l'incidence des anévrismes, ainsi qu'un volume de saignement post rupture beaucoup plus faible. Ces résultats montrent donc que l'activation du récepteur NMDA par le tPA est possiblement impliquée dans la formation et la rupture des anévrismes intracérébraux. L'ensemble de ces résultats répondent à mon deuxième objectif. De plus, de manière également intéressante, mes résultats montrent que l'utilisation du Glunomab[®] pourrait être un outil thérapeutique pour le traitement de cette pathologie.

Bibliographie

- Aasted, Bent. 1980. "Purification and Characterization of Human Vascular Plasminogen Activator." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 621(2): 241–54. [https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/0005-2795\(80\)90176-2](https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/0005-2795(80)90176-2).
- Albrechtsen, Ole K. 1957. "The Fibrinolytic Activity of Human Tissues." *British Journal of Haematology* 3(3): 284–91. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.1957.tb05798.x>.
- Ananda, A, Noor Azman A R, and Sharon Casilda. 2015. "Special Issue - Neuroscience Tranexamic Acid as Antifibrinolytic Agent in Non Traumatic Intracerebral Hemorrhages." : 62–71.
- Anfray, Antoine et al. 2020. "Circulating TPA Contributes to Neurovascular Coupling by a Mechanism Involving the Endothelial NMDA Receptors." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 40(10): 2038–54.
- Angles-Cano, Eduardo et al. 1985. "Production of Monoclonal Antibodies to the High Fibrin-Affinity, Tissue-Type Plasminogen Activator of Human Plasma. Demonstration of Its Endothelial Origin by Immunolocalization." *Blood* 66(4): 913–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3929861>.
- Annane, Djillali, Guy Decaux, and Neila Smith. 2009. "Efficacy and Safety of Oral Conivaptan, a Vasopressin-Receptor Antagonist, Evaluated in a Randomized, Controlled Trial in Patients with Euvolemic or Hypervolemic Hyponatremia." *The American journal of the medical sciences* 337(1): 28–36. <http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=19057376&lang=fr&site=eds-live>.
- Aquilina, Kristian., Ela. Chakkarapani, and Marianne. Thoresen. 2012. "Early Deterioration of Cerebrospinal Fluid Dynamics in a Neonatal Piglet Model of Intraventricular Hemorrhage and Posthemorrhagic Ventricular Dilation." *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* 10(6): 529–37. <https://thejns.org/view/journals/j-neurosurg-pediatr/10/6/article-p529.xml>.
- Ariëns, Robert A.S. et al. 2002. "Role of Factor XIII in Fibrin Clot Formation and Effects of Genetic Polymorphisms." *Blood* 100(3): 743–54.

- Ariesen, M. J., S. P. Claus, G. J.E. Rinkel, and A. Algra. 2003. "Risk Factors for Intracerebral Hemorrhage in the General Population: A Systematic Review." *Stroke* 34(8): 2060–65.
- Aronowski, Jaroslaw, and Christiana E Hall. 2013. "Neurological Research A Journal of Progress in Neurosurgery, Neurology and Neuro Sciences New Horizons for Primary Intracerebral Hemorrhage Treatment: Experience From Preclinical Studies New Horizons for Primary Intracerebral Hemorrhage Treatment: Experience from Preclinical Studies." <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=yner20>.
- Aronowski, Jaroslaw, and Xiurong Zhao. 2011. "Molecular Pathophysiology of Cerebral Hemorrhage: Secondary Brain Injury." *Stroke* 42(6): 1781–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527759> (February 12, 2019).
- Asahi, Minoru et al. 2001. "Effects of Matrix Metalloproteinase-9 Gene Knock-out on the Proteolysis of Blood-Brain Barrier and White Matter Components after Cerebral Ischemia." *Journal of Neuroscience* 21(19): 7724–32.
- van Asch, Charlotte Jj et al. 2010. "Incidence, Case Fatality, and Functional Outcome of Intracerebral Haemorrhage over Time, According to Age, Sex, and Ethnic Origin: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Lancet. Neurology* 9(2): 167–76.
- Åstedt, B, I Lecander, and T Ny. 1987. "The Placental Type Plasminogen Activator Inhibitor, PAI 2." *Fibrinolysis* 1(4): 203–8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0268949987900373>.
- Auer, L M et al. 1989. "Endoscopic Surgery versus Medical Treatment for Spontaneous Intracerebral Hematoma: A Randomized Study." *Journal of neurosurgery* 70(4): 530–35. <http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=2926492&lang=fr&site=eds-live>.
- Awad, Issam A et al. 2019. "Surgical Performance Determines Functional Outcome Benefit in the Minimally Invasive Surgery Plus Recombinant Tissue Plasminogen Activator for Intracerebral Hemorrhage Evacuation (MISTIE) Procedure." *Clinical Neurosurgery* 84(6): 1157–68.
- Baeuerle, P A, and T Henkel. 1994. "Function and Activation of NF-Kappa B in the Immune System." *Annual review of immunology* 12: 141–79.

<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=8011280&lang=fr&site=eds-live>.

Bai, Qian et al. 2020. "Intracerebral Haemorrhage: From Clinical Settings to Animal Models." *Stroke and Vascular Neurology*.

Baker, Joffre, and Robert Gronke. 1986. "Protease Nexins and Cellular Regulation." *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 12(03): 216–20.

<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=3775388&lang=fr&site=eds-live>.

Balduini, Carlo L. et al. 1999. "In Vitro and in Vivo Effects of Desmopressin on Platelet Function." *Haematologica* 84(10): 891–96.

Benchenane, Karim et al. 2007. "Anti-NR1 N-Terminal-Domain Vaccination Unmasks the Crucial Action of TPA on NMDA-Receptor-Mediated Toxicity and Spatial Memory." *Journal of cell science* 120(Pt 4): 578–85.

Bertrand, T et al. 2015. "Conformations of Tissue Plasminogen Activator (TPA) Orchestrate Neuronal Survival by a Crosstalk between EGFR and NMDAR." *Cell Death & Disease* 6(10): e1924–e1924. <http://www.nature.com/articles/cddis2015296> (March 11, 2019).

Bhatia, Rohit et al. 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(10): 2254–58.

Bilguvar, Kaya et al. 2008. "Susceptibility Loci for Intracranial Aneurysm in European and Japanese Populations." <http://www.nature.com/naturegenetics>.

Bonnard, T., L. S. Law, Z. Tennant, and C. E. Hagemeyer. 2017. "Development and Validation of a High Throughput Whole Blood Thrombolysis Plate Assay." *Scientific Reports* 7(1): 2346. <http://www.nature.com/articles/s41598-017-02498-2> (January 14, 2019).

Boose, Jeri Ann et al. 1989. "The Single-Chain Form of Tissue-Type Plasminogen Activator Has Catalytic Activity: Studies with a Mutant Enzyme That Lacks the Cleavage Site." *Biochemistry* 28(2): 635–43. <https://doi.org/10.1021/bi00428a033>.

Boucher, P. 2003. "LRP: Role in Vascular Wall Integrity and Protection from Atherosclerosis." *Science* 300(5617): 329–32. <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1080699>.

- Bromberg, J E et al. 1995. "Familial Subarachnoid Hemorrhage: Distinctive Features and Patterns of Inheritance." *Annals of neurology* 38(6): 929–34.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=8526466&lang=fr&site=eds-live>.
- Brouwers, H. Bart, and Steven M. Greenberg. 2013. "Hematoma Expansion Following Acute Intracerebral Hemorrhage." *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 35(3): 195.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466430> (October 16, 2019).
- Brown, L C, and J T Powell. 1999. "Risk Factors for Aneurysm Rupture in Patients Kept under Ultrasound Surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants." *Annals of surgery* 230(3): 289–96.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=10493476&lang=fr&site=eds-live>.
- Brown, Robert D Jr et al. 2005. "Natural History, Evaluation, and Management of Intracranial Vascular Malformations." *Mayo Clinic proceedings* 80(2): 269–81.
- Bu, Guojun, Suzanne Williams, Dudley K. Strickland, and Alan L. Schwartz. 1992. "Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein/A2-Macroglobulin Receptor Is an Hepatic Receptor for Tissue-Type Plasminogen Activator." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(16): 7427–31.
- Carlson, Karen Sue B. et al. 2016. "Neuroserpin Differentiates between Forms of Tissue Type Plasminogen Activator via PH Dependent Deacylation." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10(JUN). www.frontiersin.org.
- Carmeliet, Peter et al. 1994. "Physiological Consequences of Loss of Plasminogen Activator Gene Function in Mice." *Nature* 368(6470): 419–24.
<http://www.nature.com/articles/368419a0> (April 2, 2019).
- . 1995. "7 Physiological Consequences of over or Under-Expression of Fibrinolytic System Components in Transgenic Mice." *Bailliere's Clinical Haematology* 8(2): 391–401.
- Cebral, Juan R et al. 2016. "Regional Mapping of Flow and Wall Characteristics of Intracranial Aneurysms." *Annals of Biomedical Engineering* 44(12): 3553–67.
- Chalouhi, Nohra et al. 2011. "The Case for Family Screening for Intracranial Aneurysms."

- Neurosurgical Focus* 31(6): E8. <https://thejns.org/view/journals/neurosurg-focus/31/6/2011.9.focus11210.xml>.
- Chambers, I R et al. 2009. "Intracranial Pressure within a Developing Intracerebral Haemorrhage." 8697: 6–8.
- Chandler, W. L. et al. 1997. "Clearance of Tissue Plasminogen Activator (TPA) and TPA/Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) Complex." *Circulation* 96(3): 761–68.
- Chemmanam, Thomas, and Stephen Davis. 2009. "Intracerebral Hemorrhage." In *Stroke*, eds. J. Ricardo Carhuapoma, Stephan A. Mayer, and Daniel F. Hanley. Cambridge University Press, 174–95. <https://www.cambridge.org/core/books/intracerebral-hemorrhage/0BFAB56F9B56100D9DDB718956A6446D>.
- Chen, San-Ni et al. 2003. "Retinal Toxicity of Intravitreal Tissue Plasminogen Activator: Case Report and Literature Review." *Ophthalmology* 110(4): 704–8. [http://10.0.3.248/S0161-6420\(02\)01979-6](http://10.0.3.248/S0161-6420(02)01979-6).
- Cherian, Shobha S et al. 2003. 62 *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology Posthemorrhagic Ventricular Dilation in the Neonate: Development and Characterization of a Rat Model*. <https://academic.oup.com/jnen/article/62/3/292/2916487>.
- Chevilly, Arnaud et al. 2015. "Impacts of Tissue-Type Plasminogen Activator (TPA) on Neuronal Survival." *Frontiers in cellular neuroscience* 9: 415. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26528141> (October 28, 2019).
- Choi, Ben H et al. 1990. 7 *American Journal of Pathology Rapid Communication Protease Nexin-1 Localization in the Human Brain Suggests a Protective Role Against Extravasated Serine Proteases*.
- Collen, D., and H. R. Lijnen. 1991. "Basic and Clinical Aspects of Fibrinolysis and Thrombolysis." *Blood* 78(12): 3114–24.
- Collet, J P et al. 2006. "Altered Fibrin Architecture Is Associated With Hypofibrinolysis and Premature Coronary Atherothrombosis." <http://www.atvbaha.org>.
- Corry, Jesse J et al. 2020. "Conivaptan for the Reduction of Cerebral Edema in Intracerebral Hemorrhage: A Safety and Tolerability Study." *Clinical Drug Investigation* 40(5): 503.

<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=edssjs&AN=edssjs.EB335D24&lang=fr&site=eds-live>.

- Diamond, S. L., S. G. Eskin, and L. V. McIntire. 1989. "Fluid Flow Stimulates Tissue Plasminogen Activator Secretion by Cultured Human Endothelial Cells." *Science* 243(4897): 1483–85.
- Docagne, Fabian et al. 1999. "Transforming Growth Factor- β 1 as a Regulator of the Serpins/T-PA Axis in Cerebral Ischemia." *The FASEB Journal* 13(11): 1315–24.
- Drake, T A, J H Morrissey, and T S Edgington. 1989. "Selective Cellular Expression of Tissue Factor in Human Tissues. Implications for Disorders of Hemostasis and Thrombosis." *The American journal of pathology* 134(5): 1087–97.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2719077>.
- Ducruet, Andrew F et al. 2010. "Exacerbation of Perihematoma Edema and Sterile Meningitis With Intraventricular Administration of Tissue Plasminogen Activator in Patients With Intracerebral Hemorrhage." *Neurosurgery* 66(4): 648–55.
<https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000360374.59435.60>.
- Eeckhout, Y., and G. Vaes. 1977. "Further Studies on the Activation of Procollagenase, the Latent Precursor of Bone Collagenase. Effects of Lysosomal Cathepsin B, Plasmin and Kallikrein, and Spontaneous Activation." *Biochemical Journal* 166(1): 21–31.
- Emlet, Lillian L, and David Crippen. 2006. "Early Recombinant Activated Factor VII for Intracerebral Hemorrhage Reduced Hematoma Growth and Mortality, While Improving Functional Outcomes."
<http://ccforum/content/10/1/304><http://ccforum/content/10/1/304>.
- Etminan, Nima et al. 2015. "Cerebral Aneurysms: Formation, Progression and Developmental Chronology Nima." *Translational Stroke Research* 5(2): 167–73.
- Evans LL, D., M. McGrogan, R. W. Scott, and R. W. Carrell. 1991. "Protease Specificity and Heparin Binding and Activation of Recombinant Protease Nexin I." *Journal of Biological Chemistry* 266(33): 22307–12.
- Fang, Huang et al. 2013. 10 *Journal of Neuroinflammation Toll-like Receptor 4 Signaling in Intracerebral Hemorrhage-Induced Inflammation and Injury*.
<http://www.jneuroinflammation.com/content/10/1/27>.

- Feldmann, Edward et al. 2005. "Major Risk Factors for Intracerebral Hemorrhage in the Young Are Modifiable." *Stroke* 36(9): 1881–85.
- Fennell, Vernard S et al. 2016. "Biology of Saccular Cerebral Aneurysms: A Review of Current Understanding and Future Directions." *Frontiers in surgery* 3: 43.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27504449> (October 28, 2019).
- Fernández-Monreal, Mónica et al. 2004. "Arginine 260 of the Amino-Terminal Domain of NR1 Subunit Is Critical for Tissue-Type Plasminogen Activator-Mediated Enhancement of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Signaling." *Journal of Biological Chemistry* 279(49): 50850–56.
- Ferns, Sandra P. et al. 2011. "De Novo Aneurysm Formation and Growth of Untreated Aneurysms: A 5-Year MRA Follow-up in a Large Cohort of Patients with Coiled Aneurysms and Review of the Literature." *Stroke* 42(2): 313–18.
- Fouda, Abdelrahman Y. et al. 2017. "Minocycline in Acute Cerebral Hemorrhage an Early Phase Randomized Trial." *Stroke* 48(10): 2885–87.
- Fredriksson, Linda et al. 2004. "Tissue Plasminogen Activator Is a Potent Activator of PDGF-CC." *EMBO Journal* 23(19): 3793–3802.
- Fredriksson, Linda, Monika Ehnman, Christina Fieber, and Ulf Eriksson. 2005. "Structural Requirements for Activation of Latent Platelet-Derived Growth Factor CC by Tissue Plasminogen Activator." *The Journal of biological chemistry* 280(29): 26856–62.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15911618> (September 9, 2019).
- Frey, Uwe. 1996. "A Different Form of Long-Lasting Potentiation Revealed in Tissue Plasminogen Activator Mutant Mice." *the journal of neuroscience* 16(6): 2057–63.
<https://www.jneurosci.org/content/jneuro/16/6/2057.full.pdf>.
- Frösen, Juhana et al. 2004. "Remodeling of Saccular Cerebral Artery Aneurysm Wall Is Associated With Rupture." *Stroke* 35(10): 2287–93.
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.STR.0000140636.30204.da> (September 23, 2019).
- . 2006. "Growth Factor Receptor Expression and Remodeling of Saccular Cerebral Artery Aneurysm Walls: Implications for Biological Therapy Preventing Rupture." *Neurosurgery* 58(3): 534–41. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000197332.55054.C8>.

- . 2012. "Saccular Intracranial Aneurysm: Pathology and Mechanisms." *Acta Neuropathologica* 123(6): 773–86. <http://link.springer.com/10.1007/s00401-011-0939-3> (September 23, 2019).
- . 2013. *Lipid Accumulation, Lipid Oxidation, and Low Plasma Levels of Acquired Antibodies against Oxidized Lipids Associate with Degeneration and Rupture of the Intracranial Aneurysm Wall*. <http://www.actaneurocomms.org/content/1/1/71>.
- Frösen, Juhana, Juan Cebal, Anne M. Robertson, and Tomohiro Aoki. 2019. "Flow-Induced, Inflammation-Mediated Arterial Wall Remodeling in the Formation and Progression of Intracranial Aneurysms." *Neurosurgical Focus* 47(1): E21. <https://thejns.org/doi/abs/10.3171/2019.5.FOCUS19234> (July 6, 2020).
- Fuchs, H. E., H. Berger, and S. V. Pizzo. 1985. "Catabolism of Human Tissue Plasminogen Activator in Mice." *Blood* 65(3): 539–44. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V65.3.539.539>.
- Fukuhara, Toru. 2015. "Geographical Analysis of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage in Japan Utilizing Publically-Accessible DPC Database" ed. Nima Etminan. *PLOS ONE* 10(3): e0122467. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0122467> (September 23, 2019).
- Furie, Karen L. et al. 2011. "Guidelines for the Prevention of Stroke in Patients with Stroke or Transient Ischemic Attack: A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association." *Stroke* 42(1): 227–76.
- Gao, Chao et al. 2014. "Role of Red Blood Cell Lysis and Iron in Hydrocephalus after Intraventricular Hemorrhage." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34(6): 1070–75.
- Garton, Thomas. et al. 2016. "Hemoglobin-Induced Neuronal Degeneration in the Hippocampus after Neonatal Intraventricular Hemorrhage." *Brain Research* 1635: 86–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.060>.
- Garton, Thomas et al. 2017. "Challenges for Intraventricular Hemorrhage Research and Emerging Therapeutic Targets." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21(12): 1111–22. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1397628>.
- Gillet, J.-L. 2015. "Anévrismes Veineux." *Journal des Maladies Vasculaires* 40(2): 72–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmv.2014.12.064>.

- Gloor, Sergio et al. 1986. "A Glia-Derived Neurite Promoting Factor with Protease Inhibitory Activity Belongs to the Protease Nexins." *Cell* 47(5): 687–93.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867486905118>.
- Gong, Y et al. 2008. "Increase in Brain Thrombin Activity after Experimental Intracerebral Hemorrhage." *Acta neurochirurgica. Supplement* 105: 47–50.
- Gorelick, Philip B. 2019. "The Global Burden of Stroke: Persistent and Disabling." *The Lancet Neurology* 18(5): 417–18. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30030-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30030-4).
- Goulay, Romain et al. 2018. "Optimized TPA: A Non-Neurotoxic Fibrinolytic Agent for the Drainage of Intracerebral Hemorrhages." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 38(7): 1180–89.
- Gross, Bradley A., Brian T. Jankowitz, and Robert M. Friedlander. 2019. "Cerebral Intraparenchymal Hemorrhage: A Review." *JAMA - Journal of the American Medical Association* 321(13): 1295–1303.
- Hacke, Werner et al. 2008. "Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke." *The New England journal of medicine* 359(13): 1317–29.
- Hajjar, K. A., A. T. Jacovina, and J. Chacko. 1994. "An Endothelial Cell Receptor for Plasminogen/Tissue Plasminogen Activator. I. Identity with Annexin II." *Journal of Biological Chemistry* 269(33): 21191–97.
- Hanley, Daniel F. et al. 2017. "Thrombolytic Removal of Intraventricular Haemorrhage in Treatment of Severe Stroke: Results of the Randomised, Multicentre, Multiregion, Placebo-Controlled CLEAR III Trial." *The Lancet* 389(10069): 603–11.
- Hanley, Daniel F et al. 2016. "Safety and Efficacy of Minimally Invasive Surgery plus Alteplase in Intracerebral Haemorrhage Evacuation (MISTIE): A Randomised, Controlled, Open-Label, Phase 2 Trial." *The Lancet Neurology* 15(12): 1228–37.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442216302344?via%3Dihub>
(January 9, 2019).
- . 2019. "Efficacy and Safety of Minimally Invasive Surgery with Thrombolysis in Intracerebral Haemorrhage Evacuation (MISTIE III): A Randomised, Controlled, Open-Label, Blinded Endpoint Phase 3 Trial." *The Lancet* 393(10175): 1021–32.
- Hart, Robert G, Silvina B Tonarelli, and Lesly A Pearce. 2005. "Avoiding Central Nervous

- System Bleeding during Antithrombotic Therapy: Recent Data and Ideas." *Stroke* 36(7): 1588–93.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=15947271&lang=fr&site=eds-live>.
- Hasan, David et al. 2012. "Upregulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1 (MPGES-1) in Wall of Ruptured Human Cerebral Aneurysms: Preliminary Results." *Stroke* 43(7): 1964–67.
- Hashimoto, Tomoki, Hui Meng, and William L. Young. 2006. "Intracranial Aneurysms: Links among Inflammation, Hemodynamics and Vascular Remodeling." *Neurological Research* 28(4): 372–80.
<http://www.pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC2754184/pdf/nihms134421.pdf>.
- HE, C. S. et al. 1989. "Tissue Cooperation in a Proteolytic Cascade Activating Human Interstitial Collagenase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(8): 2632–36.
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.86.8.2632>.
- He, Chengshi et al. 1989. "Tissue Cooperation in a Proteolytic Cascade Activating Human Interstitial Collagenase." 86(April): 2632–36.
- Hébert, M., F. Lesept, D. Vivien, and R. Macrez. 2016. "The Story of an Exceptional Serine Protease, Tissue-Type Plasminogen Activator (TPA)." *Revue Neurologique* 172(3): 186–97. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0035378715008711> (September 13, 2019).
- Hemphill, J Claude et al. 2015. "AHA / ASA Guideline Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart." : 2032–60.
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STR.0000000000000069>.
- Hogan-Cann, Adam D., Ping. Lu, and Christopher M. Anderson. 2019. "Endothelial NMDA Receptors Mediate Activitydependent Brain Hemodynamic Responses in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(21): 10229–31. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1902647116.

- Hua, Y, R F Keep, J T Hoff, and G Xi. 2008. "Deferoxamine Therapy for Intracerebral Hemorrhage." *Acta neurochirurgica. Supplement* 105: 3–6.
- Husain, S S, A A Hasan, and A Z Budzynski. 1989. "Differences between Binding of One-Chain and Two-Chain Tissue Plasminogen Activators to Non-Cross-Linked and Cross-Linked Fibrin Clots." *Blood* 74(3): 999–1006. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V74.3.999.999>.
- Inagawa, Tetsuji, and Asao Hirano. 1990. "Autopsy Study of Unruptured Incidental Intracranial Aneurysms." *Surgical Neurology* 34(6): 361–65. [http://10.0.3.248/0090-3019\(90\)90237-J](http://10.0.3.248/0090-3019(90)90237-J).
- Jean-Claude, J et al. 1994. "Possible Key Role for Plasmin in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysms." *Surgery* 116(2): 472–78.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=8048013&lang=fr&site=eds-live>.
- Johnson, Catherine Owens et al. 2019. "Global, Regional, and National Burden of Stroke, 1990–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." *The Lancet Neurology* 18(5): 439–58.
- Kagitani, Hitoshi et al. 1985. "Expression in E. Coli of Finger-Domain Lacking Tissue-Type Plasminogen Activator with High Fibrin Affinity." *FEBS Letters* 189(1): 145–49.
- Van Kammen, Mayte Sánchez et al. 2018. "Heritability of Circle of Willis Variations in Families with Intracranial Aneurysms." *PLoS ONE* 13(1): 1–9.
- Karimy, Jason K. et al. 2017. "Inflammation-Dependent Cerebrospinal Fluid Hypersecretion by the Choroid Plexus Epithelium in Posthemorrhagic Hydrocephalus." *Nature Medicine* 23(8): 997–1003.
- Kashiwazaki, Daina, and Satoshi Kuroda. 2013. "Size Ratio Can Highly Predict Rupture Risk in Intracranial Small (<5 Mm) Aneurysms." *Stroke* 44(8): 2169–73.
- Kataoka, Kazuo et al. 1999. "Structural Fragility and Inflammatory Response of Ruptured Cerebral Aneurysms: A Comparative Study between Ruptured and Unruptured Cerebral Aneurysms." *Stroke* 30(7): 1396–1401. <http://ahajournals.org> (June 8, 2021).
- Keedy, Alexander. 2006. "An Overview of Intracranial Aneurysms." 9(2): 141–46.
- Keric, Naureen et al. 2017. "Optimization of Catheter Based RtPA Thrombolysis in a Novel In

- Vitro Clot Model for Intracerebral Hemorrhage.” *BioMed Research International* 2017: 1–8. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/5472936/> (November 14, 2018).
- Kleinloog, Rachel et al. 2018. “Risk Factors for Intracranial Aneurysm Rupture: A Systematic Review.” *Neurosurgery* 82(4): 431–40. <https://doi.org/10.1093/neuros/nyx238>.
- de la Fuente, B, C K Kasper, F R Rickles, and L W Hoyer. 1985. “Response of Patients with Mild and Moderate Hemophilia A and von Willebrand’s Disease to Treatment with Desmopressin.” *Annals of internal medicine* 103(1): 6–14.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=3923887&lang=fr&site=eds-live>.
- Labeyrie, Paul-Emile et al. 2017. “Vascular Tissue-Type Plasminogen Activator Promotes Intracranial Aneurysm Formation.” *Stroke* 48(9): 2574–82.
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.117.017305> (January 11, 2019).
- Labib, Mohamed A et al. 2017. “The Safety and Feasibility of Image-Guided BrainPath-Mediated Transsulcul Hematoma Evacuation: A Multicenter Study.” *Neurosurgery* 80(4): 515–24.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=edo&AN=129374819&lang=fr&site=eds-live>.
- Lasheras, Juan C. 2007. “The Biomechanics of Arterial Aneurysms.” *Annual Review of Fluid Mechanics* 39: 293–319.
- Lee, S. H. et al. 2013. “Effects of Celecoxib on Hematoma and Edema Volumes in Primary Intracerebral Hemorrhage: A Multicenter Randomized Controlled Trial.” *European Journal of Neurology* 20(8): 1161–69.
- Lehmann, J, F Colpaert, and H Canton. 1991. “Glutamate and Glycine Co-Activate While Polyamines Merely Modulate the NMDA Receptor Complex.” *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 15(2): 183–90.
- Lemaistre, Jillian L. et al. 2012. “Coactivation of NMDA Receptors by Glutamate and D-Serine Induces Dilation of Isolated Middle Cerebral Arteries.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32(3): 537–47. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2011.161>.
- Lesept, Flavie et al. 2016. “Tissue-Type Plasminogen Activator Controls Neuronal Death by Raising Surface Dynamics of Extrasynaptic NMDA Receptors.” *Cell Death & Disease*

- 7(11): e2466–e2466. www.nature.com/cddis.
- Lethagen, S. 1997. "Desmopressin - a Haemostatic Drug: State-of-the-Art Review." *European Journal of Anaesthesiology | EJA* 14.
https://journals.lww.com/ejanaesthesiology/Fulltext/1997/03001/Desmopressin___a_haemostatic_drug_.2.aspx.
- Levin, E G, and G J del Zoppo. 1994. "Localization of Tissue Plasminogen Activator in the Endothelium of a Limited Number of Vessels." *The American journal of pathology* 144(5): 855–61.
- Lijnen, H. R. 2001. "Plasmin and Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling." *Thrombosis and Haemostasis* 86(1): 324–33.
- Lijnen, H. Roger, and Desire Collen. 1995. "Mechanisms of Physiological Fibrinolysis." *Baillière's Clinical Haematology* 8(2): 277–90.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0950353605802689>.
- Lijnen, H.R., J. Silence, B. Van Hoef, and D. Collen. 1998. "Stromelysin-1 (MMP-3)–Independent Gelatinase Expression and Activation in Mice." *Blood* 91(6): 2045–53.
<http://dx.doi.org/10.1182/blood.V91.6.2045>.
- Lindgren, Antti E, Arttu Kurtelius, and Mikael von und zu Fraunberg. 2017. "The Genetics of Intracranial Aneurysms." *Current Genetic Medicine Reports* 5(1): 8.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=edssjs&AN=edssjs.81468433&lang=fr&site=eds-live>.
- Lindholt, J. S. 2006. "Activators of Plasminogen and the Progression of Small Abdominal Aortic Aneurysms." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1085(1): 139–50.
<http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1383.023>.
- Lindholt, J. S., B. Jørgensen, G. P. Shi, and E. W. Henneberg. 2003. "Relationships between Activators and Inhibitors of Plasminogen, and the Progression of Small Abdominal Aortic Aneurysms." *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 25(6): 546–51.
- Lo, Eng H., Xiaoying Wang, and M. Louise Cuzner. 2002. "Extracellular Proteolysis in Brain Injury and Inflammation: Role for Plasminogen Activators and Matrix Metalloproteinases." *Journal of Neuroscience Research* 69(1): 1–9.

- Lockwood, C. J. et al. 2009. "Involvement of Human Decidual Cell-Expressed Tissue Factor in Uterine Hemostasis and Abruptio." *Thrombosis Research* 124(5): 516–20.
- Loftspring, Matthew C, Craig Hansen, and Joseph F Clark. 2010. "A Novel Brain Injury Mechanism after Intracerebral Hemorrhage: The Interaction between Heme Products and the Immune System." *Medical Hypotheses* 74(1): 63–66.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987709005489>.
- Lopez-Atalaya, Jose P. et al. 2008. "Toward Safer Thrombolytic Agents in Stroke: Molecular Requirements for NMDA Receptor-Mediated Neurotoxicity." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28(6): 1212–21.
- Lusardi, Theresa A et al. 2004. "Effect of Acute Calcium Influx after Mechanical Stretch Injury in Vitro on the Viability of Hippocampal Neurons." *Journal of neurotrauma* 21(1): 61–72.
- Luther, T et al. 1996. "Tissue Factor Expression during Human and Mouse Development." *The American journal of pathology* 149(1): 101–13.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8686734>.
- Macrez, Richard et al. 2016. "Neuroendothelial NMDA Receptors as Therapeutic Targets in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Brain* 139(9): 2406–19.
- Mali, Raghuveer S., Mei Cheng, and Shravan K. Chintala. 2005. "Plasminogen Activators Promote Excitotoxicity-induced Retinal Damage." *The FASEB Journal* 19(10): 1280–89.
- Marcos-Contreras, Oscar A et al. 2016. "Hyperfibrinolysis Increases Blood-Brain Barrier Permeability by a Plasmin- and Bradykinin-Dependent Mechanism." *Blood* 128(20): 2423–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27531677> (September 18, 2019).
- Marenco-Hillebrand, Lina et al. 2020. "Minimally Invasive Surgery and Transsulcal Parafascicular Approach in the Evacuation of Intracerebral Haemorrhage." *Stroke and Vascular Neurology* 5(1): 40–49.
- Martí-Fàbregas, Joan, Salvador Piles, Esteve Guardia, and Josep Lluís Martí-Vilalta. 1999. "Spontaneous Primary Intraventricular Hemorrhage: Clinical Data, Etiology and Outcome." *Journal of Neurology* 246(4): 287–91.
- McGloughlin, T M. 2011. *Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials Biomechanics and Mechanobiology of Aneurysms*.

<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-18095-8>.

- Mehra, Anupriya et al. 2016. "The Plasminogen Activation System in Neuroinflammation." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1862(3): 395–402.
- . 2020. "Nonionotropic Action of Endothelial NMDA Receptors on Blood–Brain Barrier Permeability via Rho/ROCK-Mediated Phosphorylation of Myosin." *Journal of Neuroscience* 40(8): 1778–87.
- Molenberg, Rob et al. 2019. "Clinical Relevance of Short-Term Follow-up of Unruptured Intracranial Aneurysms." *Neurosurgical Focus* 47(1): 1–5.
- Montaner, Joan et al. 2001. "Matrix Metalloproteinase Expression Is Related to Hemorrhagic Transformation after Cardioembolic Stroke." *Stroke* 32(12): 2762–67.
- Mracsko, Eva, and Roland Veltkamp. 2014. "Neuroinflammation after Intracerebral Hemorrhage." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8(November): 1–13.
- Muratoglu, Selen C. et al. 2013. "LRP1 Protects the Vasculature by Regulating Levels of Connective Tissue Growth Factor and HtrA1." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33(9): 2137–46.
- Murayama, Yuichi et al. 2016. "Risk Analysis of Unruptured Intracranial Aneurysms: Prospective 10-Year Cohort Study." *Stroke* 47(2): 365–71.
- Naff, Neal et al. 2011. "Low-Dose Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator Enhances Clot Resolution in Brain Hemorrhage: The Intraventricular Hemorrhage Thrombolysis Trial." *Stroke* 42(11): 3009–16.
- Nagahiro, S et al. 1995. "Thrombosed Growing Giant Aneurysms of the Vertebral Artery: Growth Mechanism and Management." *Journal of neurosurgery* 82(5): 796–801.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=7714605&lang=fr&site=eds-live>.
- Nagaoka, Marcia R, Erika Strital, Maria Kouyoumdjian, and Durval R Borges. 2002. "Participation of a Galectin-Dependent Mechanism in the Hepatic Clearance of Tissue-Type Plasminogen Activator and Plasma Kallikrein." *Thrombosis research* 108(4): 257–62.
- Naidech, Andrew M. et al. 2014. "Desmopressin Improves Platelet Activity in Acute

- Intracerebral Hemorrhage.” *Stroke; a journal of cerebral circulation* 45(8): 2451–53.
- Nakamura, Takehiro et al. 2005. “Oxidative DNA Injury after Experimental Intracerebral Hemorrhage.” *Brain Research* 1039(1–2): 30–36.
- Nicole, Olivier et al. 2001. “The Proteolytic Activity of Tissue-Plasminogen Activator Enhances NMDA Receptor-Mediated Signaling.” *Nature Medicine* 7(1): 59–64.
- Nieuwkamp, Dennis J. et al. 2009. “Changes in Case Fatality of Aneurysmal Subarachnoid Haemorrhage over Time, According to Age, Sex, and Region: A Meta-Analysis.” *The Lancet Neurology* 8(7): 635–42. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70126-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70126-7).
- Obiang, Pauline et al. 2012. “GluN2D Subunit-Containing NMDA Receptors Control Tissue Plasminogen Activator-Mediated Spatial Memory.” *Journal of Neuroscience* 32(37): 12726–34.
- Osterwalder, T. et al. 1996. “Neuroserpin, an Axonally Secreted Serine Protease Inhibitor.” *EMBO Journal* 15(12): 2944–53.
- Oszajca, Katarzyna et al. 2014. “The Study of T-PA, u-PA and PAI-1 Genes Polymorphisms in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm.” *Molecular Biology Reports* 41(5): 2859–64. <http://link.springer.com/10.1007/s11033-014-3141-6>.
- Otter, M. et al. 1992. “Characterization of the Interaction Both in Vitro and in Vivo of Tissue-Type Plasminogen Activator (t-PA) with Rat Liver Cells. Effects of Monoclonal Antibodies to t-PA.” *Biochemical Journal* 284(2): 545–50.
- Parcq, J. et al. 2013. “Molecular Requirements for Safer Generation of Thrombolytics by Bioengineering the Tissue-Type Plasminogen Activator A Chain.” *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11(3): 539–46.
- Park, Hee Kwon, Seung Hoon Lee, Kon Chu, and Jae Kyu Roh. 2009. “Effects of Celecoxib on Volumes of Hematoma and Edema in Patients with Primary Intracerebral Hemorrhage.” *Journal of the Neurological Sciences* 279(1–2): 43–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2008.12.020>.
- Park, Laibaik et al. 2020. “TPA Deficiency Underlies Neurovascular Coupling Dysfunction by Amyloid-B.” *Journal of Neuroscience* 40(42): 8160–73.
- Pasquet, Nolwenn et al. 2019. “Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis

- Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells.” *Cerebral Cortex* 29(6): 2482–98.
<https://academic.oup.com/cercor/article/29/6/2482/5033558> (September 18, 2019).
- Pennica, Diane et al. 1983. “Cloning and Expression of Human Tissue-Type Plasminogen Activator cDNA in E. Coli.” *Nature* 301(5897): 214–21.
- Pereira, Vitor Mendes et al. 2013. “Biology and Hemodynamics of Aneurismal Vasculopathies.” *European Journal of Radiology* 82(10): 1606–17.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0720048X12006390> (September 18, 2019).
- Perrone, Ronald D, Adel M Malek, and Terry Watnick. 2015. “Vascular Complications in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease.” *Nature Reviews Nephrology* 11(10): 589–98.
- Petersen, Lars C. 1988. “The Effect of Polymerised Fibrin on the Catalytic Activities of One-Chain Tissue-Type Plasminogen Activator as Revealed by an Analogue Resistant to Plasmin Cleavage Marie J o h a n n e s s e n a D o n Foster b A s h o k K u m a r B.” 952: 245–54.
- Piebalgs, Andris et al. 2018. “Computational Simulations of Thrombolytic Therapy in Acute Ischaemic Stroke.” *Scientific Reports* 8(1): 1–13.
- Pinho, João et al. 2019. “Intracerebral Hemorrhage Outcome: A Comprehensive Update.” *Journal of the Neurological Sciences* 398: 54–66.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022510X19300139>.
- Piriyawat, Paisith et al. 2004. “Treatment of Acute Intracerebral Hemorrhage with Epsilon-Aminocaproic Acid: A Pilot Study.” *Neurocritical care* 1(1): 47–51.
- Qian, Zhuo et al. 1993. “Tissue-Plasminogen Activator Is Induced as an Immediate–Early Gene during Seizure, Kindling and Long-Term Potentiation.” *Nature* 361(6411): 453–57.
<http://www.nature.com/articles/361453a0>.
- Qin, Liya, and Fulton T. Crews. 2012. “NADPH Oxidase and Reactive Oxygen Species Contribute to Alcohol-Induced Microglial Activation and Neurodegeneration.” *Journal of Neuroinflammation* 9(1): 5. <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/5>.
- Qureshi, Adnan I., D A Wilson, D F Hanley, and R J Traystman. 1999. “No Evidence for an

- Ischemic Penumbra in Massive Experimental Intracerebral Hemorrhage." *Neurology* 52(2): 266–72.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=9932942&lang=fr&site=eds-live>.
- Qureshi, Adnan I et al. 2001. "Spontaneous Intracerebral Hemorrhage." *New England Journal of Medicine* 344(19): 1450–60.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=11346811&lang=fr&site=eds-live>.
- . 2003. "Extracellular Glutamate and Other Amino Acids in Experimental Intracerebral Hemorrhage: An in Vivo Microdialysis Study." *Critical care medicine* 31(5): 1482–89.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=12771622&lang=fr&site=eds-live>.
- Qureshi, Adnan I, A. David Mendelow, and Daniel F Hanley. 2009. "Intracerebral Haemorrhage." *The Lancet* 373(9675): 1632–44. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60371-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60371-8).
- Raghavan, Madhavan L, Baoshun Ma, and Robert E Harbaugh. 2005. "Quantified Aneurysm Shape and Rupture Risk." *Journal of neurosurgery* 102(2): 355–62.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=15739566&lang=fr&site=eds-live>.
- Reijerkerk, Arie et al. 2008. "Tissue-Type Plasminogen Activator Is a Regulator of Monocyte Diapedesis through the Brain Endothelial Barrier." *The Journal of Immunology* 181(5): 3567–74. <http://www.jimmunol.org/content/181/5/3567> (June 2, 2021).
- . 2010. "The NR1 Subunit of NMDA Receptor Regulates Monocyte Transmigration through the Brain Endothelial Cell Barrier." *Journal of Neurochemistry* 113(2): 447–53.
- Reilly, Jeffrey M, Gregorio A Sicard, and Charles L Lucore. 1994. "Abnormal Expression of Plasminogen Activators in Aortic Aneurysmal and Occlusive Disease." *Journal of Vascular Surgery* 19(5): 865–72.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0741521494700125>.
- De Reuck, Jacques, Dimitri Hemelsoet, and Georges Van Maele. 2007. "Seizures and Epilepsy in Patients with a Spontaneous Intracerebral Haematoma." *Clinical Neurology and*

- Neurosurgery* 109: 501–4.
- Ricagno, Stefano et al. 2009. “Human Neuroserpin: Structure and Time-Dependent Inhibition.” *Journal of Molecular Biology* 388(1): 109–21.
- Rijken, D. C., and D. Collen. 1981. “Purification and Characterization of the Plasminogen Activator Secreted by Human Melanoma Cells in Culture.” *Journal of Biological Chemistry* 256(13): 7035–41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69095-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69095-2).
- Ríos, José David et al. 2019. “Altered Expression of Aquaporin 1 and Aquaporin 5 in the Cornea after Primary Blast Exposure.” *Molecular Vision* 25(April 2018): 283–94.
- Ritsma, Benjamin et al. 2014. “Case Report Minimally Invasive Subcortical Parafascicular Transsulcal Access for Clot Evacuation (Mi SPACE) for Intracerebral Hemorrhage.” <http://dx.doi.org/10.1155/2014/102307>.
- De Rooij, N. K. et al. 2007. “Incidence of Subarachnoid Haemorrhage: A Systematic Review with Emphasis on Region, Age, Gender and Time Trends.” *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 78(12): 1365–72.
- Rosenberg, G A, and M Navratil. 1997. “Metalloproteinase Inhibition Blocks Edema in Intracerebral Hemorrhage in the Rat.” *Neurology* 48(4): 921–26.
- Roux, P D L, H R Winn, and D W Newell. 2004. *Management of Cerebral Aneurysms*. Saunders. <https://books.google.fr/books?id=1N9rAAAAMAAJ>.
- Sadasivan, Chander, David J. Fiorella, Henry H. Woo, and Baruch B. Lieber. 2013. “Physical Factors Effecting Cerebral Aneurysm Pathophysiology.” *Annals of Biomedical Engineering* 41(7): 1347–65.
- Salle, Fernando J, and Sidney Strickland. 2002. “Localization and Regulation of the Tissue Plasminogen Activator – Plasmin System in the Hippocampus.” 22(6): 2125–34.
- Samson, Andre L. et al. 2008. “Tissue-Type Plasminogen Activator Requires a Co-Receptor to Enhance NMDA Receptor Function.” *Journal of Neurochemistry* 107(4): 1091–1101. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x>.
- San Millán Ruíz, D et al. 2006. “The Perianeurysmal Environment: Influence on Saccular Aneurysm Shape and Rupture.” *AJNR. American journal of neuroradiology* 27(3): 504–12.

<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=16551985&lang=fr&site=eds-live>.

Sappino, André Pascal et al. 1993. "Extracellular Proteolysis in the Adult Murine Brain."

Journal of Clinical Investigation 92(2): 679–85.

Scott, R. W. et al. 1985. "Protease Nexin. Properties and a Modified Purification Procedure."

Journal of Biological Chemistry 260(11): 7029–34.

Selim, Magdy et al. 2011. "Safety and Tolerability of Deferoxamine Mesylate in Patients with Acute Intracerebral Hemorrhage." *Stroke* 42(11): 3067–74.

Simpson, C S, H M Johnston, and B J Morris. 1994. "Neuronal Expression of Protease-Nexin 1 mRNA in Rat Brain." *Neuroscience Letters* 170(2): 286–90.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304394094903395>.

Soreq, H, R Miskin, A Zutra, and U Z Littauer. 1983. "Modulation in the Levels and

Localization of Plasminogen Activator in Differentiating Neuroblastoma Cells." *Brain research* 283(2–3): 257–69.

<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=6133597&lang=fr&site=eds-live>.

Spiotta, Alejandro M et al. 2015. "Initial Multicenter Technical Experience with the Apollo Device for Minimally Invasive Intracerebral Hematoma Evacuation." *Neurosurgery* 11 Suppl 2: 243–51.

<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=25714520&lang=fr&site=eds-live>.

Sprigg, Nikola et al. 2014. "Tranexamic Acid for Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Randomized Controlled Pilot Trial (ISRCTN50867461)." *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 23(6): 1312–18.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.11.007>.

Staykov, Dimitre et al. 2011. "Natural Course of Perihemorrhagic Edema after Intracerebral Hemorrhage." *Stroke* 42(9): 2625–29.

Stehbens, W. E. 1989. "Etiology of Intracranial Berry Aneurysms." *Journal of Neurosurgery* 70(6): 823–31.

Strahle, Jennifer M et al. 2014. "Role of Hemoglobin and Iron in Hydrocephalus after

- Neonatal Intraventricular Hemorrhage." *Neurosurgery* 75(6): 696–705.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=25121790&lang=fr&site=eds-live>.
- Su, Enming J et al. 2008. "Activation of PDGF-CC by Tissue Plasminogen Activator Impairs Blood-Brain Barrier Integrity during Ischemic Stroke." *Nature Medicine* 14(7): 731–37.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
- Sun, Haixin et al. 2010. "An Effective Treatment for Cerebral Hemorrhage: Minimally Invasive Craniopuncture Combined with Urokinase Infusion Therapy." *Neurological research* 32(4): 371–77.
- Suzuki, Ko et al. 1990. "Mechanisms of Activation of Tissue Procollagenase by Matrix Metalloproteinase 3 (Stromelysin)." *Biochemistry* 29(44): 10261–70.
<https://doi.org/10.1021/bi00496a016>.
- Taylor, Roslyn A, and Lauren H Sansing. 2013. "Microglial Responses after Ischemic Stroke and Intracerebral Hemorrhage." *Clinical and Developmental Immunology* 2013.
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/746068>.
- Teesalu, Tambet et al. 2004. "Tissue Plasminogen Activator and Neuroserpin Are Widely Expressed in the Human Central Nervous System." *Thrombosis and haemostasis* 92(2): 358–68.
- The National Institute of Neurological Disorder and Stroke rt-PA Stroke Study Groupe. 1995. "TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR FOR ACUTE ISCHEMIC STROKE." *New England Journal of Medicine* 333(24): 1581–88.
<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199512143332401>.
- Thiebaut, Audrey M et al. 2018. "The Role of Plasminogen Activators in Stroke Treatment: Fibrinolysis and Beyond." *The Lancet Neurology* 17(12): 1121–32.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442218303235?via%3Dihub> (October 28, 2019).
- Thiex, Ruth et al. 2003. "The Long-Term Effect of Recombinant Tissue-Plasminogen-Activator (Rt-PA) on Edema Formation in a Large-Animal Model of Intracerebral Hemorrhage." *Neurological Research* 25(3): 254–62.
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/016164103101201463> (January 24,

2019).

- Tirschwell, D L et al. 2004. "Association of Cholesterol with Stroke Risk Varies in Stroke Subtypes and Patient Subgroups." *Neurology* 63(10): 1868–75.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=15557504&lang=fr&site=eds-live>.
- Tremmel, Markus et al. 2009. "INFLUENCE OF INTRACRANIAL ANEURYSM-TO-PARENT VESSEL SIZE RATIO ON HEMODYNAMICS AND IMPLICATION FOR RUPTURE: RESULTS FROM A VIRTUAL EXPERIMENTAL STUDY." *Neurosurgery* 64(4): 622–31.
<https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000341529.11231.69>.
- Tripputi, P. et al. 1986. "Human Histone Genes Map to Multiple Chromosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(10): 3185–88.
- Tsirka, S. E., A. D. Rogove, and S. Strickland. 1996. "Neuronal Cell Death and TPA [4]." *Nature* 384(6605): 123–24.
- Vega, Charles, Jeremiah V Kwoon, and Sean D Lavine. 2002. "Intracranial Aneurysms : Current Evidence and Clinical Practice." : 601–8.
- Verstraete, M. et al. 1985. "Pharmacokinetics and Systemic Fibrinolytic Effects of Recombinant Human Tissue-Type Plasminogen Activator (Rt-PA) in Humans." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 235(2): 506–12.
- Vlak, Monique H.M., Gabriel J.E. Rinkel, Paut Greebe, and Ale Algra. 2013. "Independent Risk Factors for Intracranial Aneurysms and Their Joint Effect: A Case-Control Study." *Stroke* 44(4): 984–87.
- Vlak, Monique Hm, Ale Algra, Raya Brandenburg, and Gabriël Je Rinkel. 2011. "Prevalence of Unruptured Intracranial Aneurysms, with Emphasis on Sex, Age, Comorbidity, Country, and Time Period: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Lancet. Neurology* 10(7): 626–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641282> (April 6, 2021).
- Wagner, Kenneth R et al. 2003. "Heme and Iron Metabolism: Role in Cerebral Hemorrhage." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23(6): 629–52.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=12796711&lang=fr&site=eds-live>.

- Walcott, Brian P., Kristopher T. Kahle, and J. Marc Simard. 2012. "Novel Treatment Targets for Cerebral Edema." *Neurotherapeutics* 9(1): 65–72.
- Wan, S et al. 2006. "Deferoxamine Reduces CSF Free Iron Levels Following Intracerebral Hemorrhage." *Acta neurochirurgica. Supplement* 96: 199–202.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=16671454&lang=fr&site=eds-live>.
- Wang, Jian, and Sylvain Doré. 2007a. "Heme Oxygenase-1 Exacerbates Early Brain Injury after Intracerebral Haemorrhage." *Brain* 130(6): 1643–52.
<https://academic.oup.com/brain/article/130/6/1643/296187>.
- . 2007b. "Inflammation after Intracerebral Hemorrhage." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27(5): 894–908.
- Wang, Wen Zhi et al. 2009. "Minimally Invasive Craniopuncture Therapy vs. Conservative Treatment for Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: Results from a Randomized Clinical Trial in China." *International Journal of Stroke* 4(1): 11–16.
- Wang, Yan-Chun et al. 2014. "Toll-like Receptor 2/4 Heterodimer Mediates Inflammatory Injury in Intracerebral Hemorrhage." *Annals of Neurology* 75(6): 876–89.
<https://doi.org/10.1002/ana.24159>.
- Wasserman, Jason K., and Lyanne C. Schlichter. 2007. "Minocycline Protects the Blood-Brain Barrier and Reduces Edema Following Intracerebral Hemorrhage in the Rat." *Experimental Neurology* 207(2): 227–37.
- Weisel, J W, and R I Litvinov. 2008. "The Biochemical and Physical Process of Fibrinolysis and Effects of Clot Structure and Stability on the Lysis Rate." *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry* 6(3): 161–80.
<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=18673231&lang=fr&site=eds-live>.
- Weisel, John W. 2007. "Structure of Fibrin: Impact on Clot Stability." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5(SUPPL. 1): 116–24.
- Williams, Lindsay N., and Robert D. Brown. 2013. "Management of Unruptured Intracranial Aneurysms." *Neurology: Clinical Practice* 3(2): 99–108.
- Woo, Daniel et al. 2002. "Genetic and Environmental Risk Factors for Intracerebral

- Hemorrhage: Preliminary Results of a Population-Based Study." *Stroke* 33(5): 1190–95.
- . 2004. "Effect of Untreated Hypertension on Hemorrhagic Stroke." *Stroke* 35(7): 1703–8.
- Wu, Fang et al. 2012. "Tissue-Type Plasminogen Activator Regulates the Neuronal Uptake of Glucose in the Ischemic Brain." *Journal of Neuroscience* 32(29): 9848–58.
- Wu, J et al. 2010. "Minocycline Attenuates Brain Edema, Brain Atrophy and Neurological Deficits after Intracerebral Hemorrhage." *Acta neurochirurgica. Supplement* 106: 147–50.
- <http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=19812938&lang=fr&site=eds-live>.
- Wu, Jimin et al. 2003. "Iron and Iron-Handling Proteins in the Brain After Intracerebral Hemorrhage." <http://ahajournals.org>.
- Yang, Shuo et al. 2013. "Hemoglobin-Induced Nitric Oxide Synthase Overexpression and Nitric Oxide Production Contribute to Blood-Brain Barrier Disruption in the Rat." *Journal of Molecular Neuroscience* 51(2): 352–63.
- Yeatts, Sharon D., Yuko Y. Palesch, Claudia S. Moy, and Magdy Selim. 2013. "High Dose Deferoxamine in Intracerebral Hemorrhage (Hi-Def) Trial: Rationale, Design, and Methods." *Neurocritical Care* 19(2): 257–66.
- Yepes, Manuel et al. 2003. "Tissue-Type Plasminogen Activator Induces Opening of the Blood-Brain Barrier via the LDL Receptor–Related Protein." *Journal of Clinical Investigation* 112(10): 1533–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617754> (January 28, 2019).
- Yu, Yao et al. 2015. "The Clinical Effect of Deferoxamine Mesylate on Edema after Intracerebral Hemorrhage." *PLoS ONE* 10(4): 1–13.
- Zhao, Xiurong et al. 2007. "Distinct Patterns of Intracerebral Hemorrhage-Induced Alterations in NF-KB Subunit, INOS, and COX-2 Expression." *Journal of Neurochemistry* 101(3): 652–63.
- Zhou, Aiwu, Robin W. Carrell, and James A. Huntington. 2001. "The Serpin Inhibitory Mechanism Is Critically Dependent on the Length of the Reactive Center Loop." *Journal of Biological Chemistry* 276(29): 27541–47. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M102594200>.

- Ziai, Wendy C. et al. 2014. "A Multicenter, Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Phase III Study of Clot Lysis Evaluation of Accelerated Resolution of Intraventricular Hemorrhage (CLEAR III)." *International Journal of Stroke* 9(4): 536–42.
- Ziai, Wendy C et al. 2012. "Factors Affecting Clot Lysis Rates in Patients With Spontaneous Intraventricular Hemorrhage." : 1234–39.

Hémorragie intracérébrale spontanée : développement d'un traitement pour les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques et physiopathologie de l'anévrisme intracérébral

Résumé

Les hémorragies cérébrales spontanées sont donc un besoin médical non satisfait. Une des stratégies pour leur traitement est le retrait de l'hématome en utilisant un thrombolytique couplé à une intervention minimisant le risque d'endommager le tissu cérébral. Mon projet de thèse était de travailler au développement d'un nouveau produit alliant un thrombolytique de nouvelle génération couplée à une formulation à relargage progressif. Les résultats obtenus ont permis de démontrer la preuve de concept pour l'utilisation d'une formulation à relargage progressif d'un thrombolytique afin d'obtenir une lyse optimale, de démontrer la supériorité de l'O2L-001 et de ce fait, un nouvel espoir pour le traitement des hémorragies intracérébrales.

La rupture des anévrismes intracrâniens est la cause la plus commune des hémorragies sous-arachnoïdiennes non traumatiques. À l'heure actuelle, les seules options de traitement possibles sont des interventions chirurgicales avec des risques non négligeables. Une meilleure compréhension de leur physiopathologie est donc cruciale pour l'amélioration du traitement des patients. Il a précédemment été démontré que l'activateur tissulaire du plasminogène pouvait être impliqué dans cette pathologie. Dans ce travail de thèse, je me suis focalisée sur la compréhension des mécanismes par lesquels l'activateur tissulaire du plasminogène était impliqué dans cette pathologie. Les résultats obtenus dans mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'interaction tPA-NMAR dans la formation et la rupture des anévrismes. De plus l'utilisation du Glunomab® permet de réduire l'incidence des anévrismes et leur rupture, ouvrant de nouvelles perspectives de traitement dans cette pathologie.

Mots-clés : AVC hémorragique, Hémorragie cérébrale, Anévrisme intracérébral, tPA

Summary

Spontaneous intracerebral haemorrhages are an unmet medical need. A strategy for their treatment is the removal of the clot by using a thrombolytic coupled with a minimally invasive intervention to decrease the risk of the lesion on the cerebral parenchyma. My thesis project is to work on the development of a new product composed of a new thrombolytic coupled with a sustain release formulation. My results allowed me to demonstrate the proof of concept for using a thrombolytic in a sustained release formulation to obtain optimized lysis and demonstrate the O2L-001 superiority, therefore a new hope for the treatment of spontaneous intracerebral haemorrhage.

The rupture of intracerebral aneurysms is the most common cause of subarachnoid haemorrhage. The only possible treatment options are surgical interventions with non-negligible risks. Therefore, understanding the biology of this pathology is crucial for better rational patient management. It was previously established that tPA could be a factor implicated in this pathology. During this thesis project, my goal was to better understand by which mechanisms the tPA is implicated in this pathology. My results allowed me to show that the interaction between tPA-NMDAR is implicated in aneurysms formation and rupture. Moreover, the use of Glunomab® allowed to reduce the incidence of aneurysms and their rupture.

Keywords: Haemorrhagic stroke, cerebral haemorrhage, intracerebral aneurysms, tPA